N° d'ordre : 1428

THESE

PRESENTEE

A L'UNIVERSITE DE PARIS XI

CENTRE D'ORSAY

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES SCIENCES NATURELLES

par

Micheline MOREL - JACROT

ETUDES *IN VIVO* SUR LA COMPOSITION EN AZOTE, CHLORE, CALCIUM ET PHOSPHORE DU RAT A L'AIDE DE L'ANALYSE PAR RADIOACTIVATION NEUTRONIQUE

Soutenue le 28 février 1975, devant la Commission d'Examen

MM. le Professeur F. CHEVALLIER Président

le Professeur G. MILHAUD

le Professeur C. KELLERSHOHN

J. LAVERLOCHERE

D. COMAR

N° d'ordre :

T H E S E

PRESENTEE

A L'UNIVERSITE DE PARIS XI

CENTRE D'ORSAY

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES SCIENCES NATURELLES

par

Micheline MOREL - JACROT

ETUDES *IN VIVO* SUR LA COMPOSITION EN AZOTE, CHLORE, CALCIUM ET PHOSPHORE DU RAT A L'AIDE DE L'ANALYSE PAR RADIOACTIVATION NEUTRONIQUE

Soutenue le 28 février 1975, devant la Commission d'Examen

MM. le Professeur F. CHEVALLIER Président

le Professeur G. MILHAUD

le Professeur C. KELLERSHOHN

J. LAVERLOCHERE

D. COMAR

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Cette thèse a été préparée au Département des Radioéléments du CEA à Grenoble et au Service Hospitalier F. JOLIOT à Orsay.

Je remercie le Commissariat à l'Energie Atomique et Monsieur le Professeur COURSAGET, Chef du Département de Biologie de m'avoir permis d'effectuer cette étude.

J'exprime ma profonde gratitude à Monsieur le Professeur CHEVALLIER qui a bien voulu diriger ce travail.

J'adresse mes remerciements à Monsieur le Professeur MILHAUD ainsi qu'à Monsieur le Professeur KELLERSHOHN qui m'ont fait l'honneur de siéger au jury de cette thèse.

En la personne de Monsieur LAVERLOCHERE je tiens à remercier tous ceux avec lesquels, à Grenoble, j'ai eu l'occasion de travailler.

Que Monsieur COMAR, qui m'a conseillé tout au long de l'élaboration de cette étude, trouve ici l'expression de ma très vive reconnaissance.

Je remercie enfin, particulièrement :

- Mesdames MOURIQUAND et PERAULT-STAUB de leur aide.
- Mes collègues du Service F. JOLIOT qui m'ont toujours encouragée.
- Monsieur BERARD et Monsieur JALLIFIER du Service des Accélérateurs (Grenoble) qui ont assuré la bonne marche du générateur de neutrons 14 MeV.
- Monsieur BOUVET auquel je dois le montage du dispositif d'irradiation tournant.
- Monsieur BOUZESKOUL qui a surveillé avec beaucoup de dévouement la présentation du manuscrit.
- Monsieur TEYTON qui a assuré l'illustration du texte.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544725_0015

P L A N

Page

INTRODUCTION 1

CHAPITRE I - METHODES D'ANALYSE DE LA COMPOSITION ELEMENTAIRE DES ORGANISMES VIVANTS 2

I - METHODES STATIQUES DE MESURE DE LA COMPOSITION ELEMENTAIRE DES ORGANISMES VIVANTS 2

1. Méthodes destructives 2

1.1 - Analyses portant sur l'ensemble de l'organisme... 2
- soit de ses principaux constituants :
Analyses chimiques traditionnelles 2
- soit des éléments à l'état de trace :
Spectrographie d'émission 3

1.2 - Analyses d'échantillons biologiques : quelques exemples d'analyses de biopsies osseuses 3
- après marquage en microscopie ultraviolette ... 4
- application de la microsonde à émission de rayons X à l'analyse quantitative 4

2. Méthodes "in vivo" 5

2.1 - Mesure de la masse potassique corporelle 5
2.2 - La photodensitométrie 5

II - METHODES D'ANALYSES FONDEES SUR LA NOTION DE DILUTION ISOTOPIQUE ET DE RENOUVELLEMENT 6

1. L'administration unique :

1.1 - La dilution isotopique 7
1.2 - Le principe d'occupation 9
1.3 - L'étude des principales voies du métabolisme calcique par la méthode d'AUBERT et MILHAUD 13

Page

2. L'administration continue :

2.1 - L'équilibre isotopique 15

III - L'ANALYSE PAR RADIOACTIVATION. PRINCIPE DE LA METHODE. 19

1. Analyses de prélèvements biologiques par radioactivation neutronique 20

2. L'analyse par radioactivation neutronique "in vivo".. 21

2.1 - Applications en physiologie humaine 21

2.2 - Expérimentation animale 32

CHAPITRE II - METHODE ET TECHNIQUES 35

I - METHODE 35

1. Généralités sur l'analyse par radioactivation neutronique et modalités de calcul..... 35

2. Caractéristiques physiques des éléments à doser 39

II - MATERIEL 39

1. Accélérateur 39

2. Dispositif d'irradiation tournant 44

3. Ensemble de comptage 44

III - ETUDE DU SPECTRE ENERGETIQUE DE NEUTRONS 46

1. Mesure et distribution du flux de neutrons rapides.. 47

2. Mesure et distribution du flux de neutrons thermiques 49

IV - PROTOCOLE EXPERIMENTAL 51

1. Temps d'irradiation 51

2. Préparation du témoin et du blanc 53

V - RESULTATS 55

Page

VI - DISCUSSION 57

1. Problème des interférences 57

1.1 - Dosage de l'azote 57
1.2 - Dosage du phosphore 60
1.3 - Dosage du chlore 61
1.4 - Dosage du calcium 61

2. Reproductibilité des résultats et homogénéité spatiale des flux de neutrons 62

2.1 - Dosage d'un élément contenu dans des volumes différents 62
2.2 - Correction due à la présence de la gélatine dans l'étalon 62
2.3 - Limites de dosages 62
2.4 - Reproductibilité des résultats 63
2.5 - Hétérogénéité des échantillons 66

3. Comparaison des résultats obtenus en analyse par radioactivation neutronique avec l'analyse destructive 66

3.1 - Mise en solution du rat 66
3.2 - Méthodes d'analyse destructives utilisées 68
3.3 - Résultats 70

4. Dosimétrie 77

VII - CONCLUSION 77

CHAPITRE III - ETUDE IN VIVO DE LA COMPOSITION EN AZOTE, CHLORE, PHOSPHORE ET CALCIUM DU RAT OFA EN FONCTION DE L'AGE ET DU SEXE..... 80

I - PROTOCOLE EXPERIMENTAL 80

1. Souche 80

2. Conditions d'élevage 80

3. Diète 80

4. Description des lots 82

5. Anesthésie 84

Page

II - RESULTATS 84

1. Etude de la croissance 84

1.1 - des animaux témoins soumis au régime 84
1.2 - des animaux irradiés 94

2. Etude de la composition en azote, chlore, phosphore et calcium en fonction de l'âge et du sexe..... 94

2.1 - à la suite d'une irradiation de neuf lots de rats 94
2.2 - à la suite d'irradiations répétées sur un même animal 100

III - DISCUSSION 100

1. Incidence de la diète et des irradiations neutroniques sur la croissance du rat OFA 100

1.1 - Incidence de la diète 100
1.2 - Incidence des irradiations répétées sur la croissance 111

2. Discussion des résultats obtenus 112

2.1 - à la suite de l'irradiation unique d'animaux groupés en différents lots 112
a) Evolution de la teneur corporelle en azote et en chlore en fonction de l'âge et du sexe. 113
b) Evolution de la teneur corporelle en calcium et en phosphore en fonction de l'âge et du sexe 114

- Aspect théorique du problème osseux 114
- Evolution du rapport en poids Ca/P corporel et osseux en fonction de l'âge et du sexe 119

2.2 - à la suite d'irradiations répétées sur le même animal au cours de la croissance 126

3. Incidence de l'irradiation sur la reproduction..... 130

4. La dosimétrie 131

5. Incidence de l'irradiation sur le développement des tumeurs mammaires 133

5.1 - Fréquence spontanée 133
5.2 - Fréquence après irradiation 135
a) Les modalités d'irradiation et la dose absorbée 137
b) Le temps de latence 139

IV - CONCLUSION 140

CONCLUSION 143

BIBLIOGRAPHIE 146

I N T R O D U C T I O N

Ce travail a pour but de mettre en évidence le rôle de l'analyse par radioactivation neutronique "in vivo" dans la détermination de la composition élémentaire de l'organisme du rat.

Dans un premier temps, les possibilités offertes par un certain nombre de méthodes, qui permettent de connaître la composition élémentaire des organismes vivants, sont analysées ainsi que la place et la portée de l'analyse par radioactivation neutronique.

Dans une deuxième partie, les modalités techniques de la radioactivation neutronique du rat "in vivo" sont déterminées et les problèmes posés par l'application de cette méthode envisagés.

L'analyse par radioactivation neutronique a été ensuite appliquée à l'étude des variations de la composition en azote, chlore, calcium et phosphore du rat au cours de la croissance (de 30 à 440 jours) et des principaux évènements de la vie biologique tels que la puberté chez les deux sexes, la reproduction et la lactation. Enfin le taux de fécondité et les effets d'irradiations répétées sur des rats d'origine Sprague-Dawley ont été également étudiés.

C H A P I T R E I

METHODES D'ANALYSE DE LA COMPOSITION ELEMENTAIRE DES ORGANISMES VIVANTS

Avant d'étudier la place et la portée que l'on peut attribuer à l'analyse par radioactivation neutronique et le but de ce travail, les possibilités offertes par un certain nombre d'autres méthodes, qui permettent de connaître la composition élémentaire des organismes vivants, sont analysées. Elles peuvent être classées en deux groupes : les méthodes statiques et les méthodes dynamiques.

I - METHODES STATIQUES DE MESURE DE LA COMPOSITION ELEMENTAIRE DES ORGANISMES VIVANTS

1. Méthodes destructives

1.1 - Analyses portant sur l'ensemble de l'organisme

- Analyses chimiques

Ce sont les plus anciennes. Les analyses sont faites soit après digestion de l'organisme en milieu acide concentré ou potasse alcoolique, soit après incinération au four à mouffles à température élevée.

SPRAY et WIDDOWSON /96/ ont ainsi étudié la composition chimique de quatre espèces animales (Rat, Lapin, Chat et Porc) en fonction de l'âge et du sexe. L'influence de la croissance, de la reproduction, de la lactation ainsi que de certaines déficiences dans

la diète sur la concentration des éléments minéraux a pu être déterminée. Les résultats de ces travaux permettent d'établir des principes généraux que les auteurs estimaient être applicables à l'homme.

De nombreuses analyses de cadavres ont été pratiquées par WIDDOWSON, McCANCE et SPRAY /106/ ainsi que par FORBES et LEWIS /44/. Elles ont permis d'estimer la composition élémentaire de l'organisme humain.

- Spectrographie d'émission

Sur les quatre vingt douze éléments de la classification périodique moins de vingt ont été identifiés comme étant des constituants normaux du tissu biologique. Parmi ceux-ci l'oxygène, le carbone, l'hydrogène et l'azote occupent 96 % de la masse totale de l'organisme. Le calcium, le phosphore, le soufre, le potassium, le sodium, le chlore et le magnésium se partagent 3,5 % du poids corporel.

Les quatre vingt un éléments, non mentionnés, appelés d'une façon générale "éléments traces" entrent pour 0,4 % environ dans la composition corporelle. Leur importance dépend de leur rôle et de leur concentration dans la matière vivante.

Un certain nombre de techniques permettent de détecter ces éléments de faible teneur. Ainsi, I.H. TIPTON /102/ utilisant la spectrographie d'émission a analysé dix-sept éléments-traces dans les tissus de soixante sept enfants et cent vingt et un adultes américains. Malheureusement, le dosage à très basse teneur, en spectrographie d'émission, manque parfois de précision. De plus les erreurs imputables aux contaminations sont difficiles à éliminer.

1.2 - Analyses d'échantillons biologiques

L'analyse de prélèvements présente un grand avantage sur les méthodes précédemment décrites. L'intégrité de l'organisme est préservé. En effet, les techniques couramment employées dans les

laboratoires sont assez sensibles pour permettre de travailler sur des volumes de plus en plus petits. A titre d'exemple quelques techniques d'analyses de ponctions biopsiques sont données :

- Techniques utilisant des marqueurs

L'emploi de la tétracycline comme marqueur osseux est fréquent . L'affinité de l'antibiotique pour l'os nouvellement formé a été fort bien étudiée par MILCH, RALL et TOBIE /74/, HARRIS /56/ et JOHNSON /63/.

Peu après l'injection, la tétracycline se fixe sur l'os. Au microscope, en lumière ultra violette, cette fixation est représentée par une fluorescence. Chaque ligne marque le temps entre les injections. On peut donc estimer la masse osseuse déposée en surface soit entre deux injections, soit entre le moment de l'injection et la biopsie et connaître le taux d'apposition journalier en microns. Mais la tétracycline ne peut être injectée à forte dose. Il est recommandé de ne pas dépasser 20 mg/kg pour de jeunes rats (STERNBERG /98/).

- Application de la microsonde à émission de rayons X à l'analyse quantitative

Cet appareil proche de la sonde de Castaing regroupe deux techniques complexes : la microscopie électronique et la spectroscopie de rayons X. Ceci permet d'analyser quantitativement dix à cent p.p.m. d'un élément contenu dans un échantillon de faible volume.

Le faisceau d'électrons est focalisé en un point de la surface du prélèvement. Le spectre de rayons X émis est caractéristique des éléments contenus dans le volume frappé par les électrons. La rotation d'un cristal, selon un angle convenable, permet la réflexion de la radiation émise par l'élément à étudier vers le détecteur.

Cette technique a permis, en 1968, à HÖLCHING, HALL, BOYDE et Von ROSENSTIEL d'analyser les premiers stades de la minéralisation en déterminant, chez l'embryon de rat, les concentrations de phosphore et de calcium dans les cellules de la matrice osseuse. A ce stade, il semble que le calcium ne soit pas lié au phosphate.

2. Méthodes "in vivo"

Les possibilités limitées des techniques destructives ont orienté les chercheurs vers l'étude du vivant.

2.1 - Mesure de la masse potassique naturelle

La mesure de la radioactivité naturelle du corps humain permet de doser le potassium. En effet le potassium naturel est un mélange de trois isotopes :

^{39}K(93,2 %) ^{40}K(0,012 %) et ^{41}K(6,8 %)

La quantité de potassium contenu dans l'organisme humain est de l'ordre de 48,5 meq/kg chez l'homme et de 37 meq/kg chez la femme soit environ 10^{-2} µC exprimé en potassium -40. Ce radioélément de période $1,26.10^{9}$ années est émetteur d'une raie gamma à 1,46 MeV. Il est donc possible, à l'aide d'un détecteur suffisamment efficace convenablement étalonné et parfaitement protégé de la radioactivité naturelle ambiante et à partir du taux de comptage du potassium -40 présent dans l'organisme d'en déduire la masse totale du potassium.

D'autres radioisotopes entrent dans la composition de certains éléments naturels. Ainsi le rubidium-87, de période $4,8.10^{10}$ années, représente 27,85 % du rubidium naturel, si bien que la masse totale de rubidium de l'organisme humain correspond à 5.10^{-3} µC. Malheureusement le rubidium-87 est uniquement émetteur de rayonnement β^- . Il n'est donc pas détectable par comptage externe.

2.2 - La photodensitométrie

L'examen radiologique par rayons X ne permet pas de mettre en évidence des variations inférieures à 30 % de la masse totale du squelette.

En 1963, CAMERON et SORENSON /16/ mettent au point une nouvelle technique d'approche de la masse osseuse. Le faisceau de rayons X est remplacé par une source collimée de photons monoénergétiques de faibles énergies. L'atténuation du flux de photons par

l'os, proportionnelle à la densité et à l'épaisseur des tissus, est mesurée à l'aide d'un détecteur à scintillation. Pour diminuer les artefacts, produits par les tissus mous, le membre ou son extrémité est plongé dans l'eau.

Les sources utilisées actuellement sont de l'iode-125 émetteur de photons de 27,4 keV, et de l'américium-241 émetteur de photons de 60 keV.

La précision et la reproductibilité de la méthode sont grandes. Son application devrait permettre un diagnostic précoce de l'ostéoporose. Malheureusement, comme l'histologie semi-quantitative pratiquée à partir de ponctions biopsiques, cette méthode ne permet d'obtenir qu'une évaluation de la masse osseuse dans une région bien déterminée du squelette et ne renseigne pas sur sa composition élémentaire.

II - METHODES D'ANALYSES FONDEES SUR LA NOTION DE DILUTION ISOTOPIQUE ET DE RENOUVELLEMENT

Tout métabolisme peut être considéré comme une suite d'évènements discontinus. En première analyse, on peut les ranger dans deux types de processus qui permettent de les caractériser. Ce sont les déplacements et les modifications de structure.

Si les systèmes étudiés sont en état stationnaire, l'intensité de chacun des évènements (nombre de molécules déplacées ou transformées par unité de temps) reste constante pendant la durée de l'observation.

La notion de renouvellement suppose une entité spatiale siège de ce processus : c'est le compartiment. Sa délimitation ne correspond pas forcément à une délimitation anatomique. Il s'agit d'un concept fonctionnel qui se justifie par les études cinétiques dans la mesure où les conditions d'homogénéité et de probabilité de renouvellement sont respectées.

C'est l'emploi des indicateurs nucléaires qui a permis de transformer la notion de renouvellement en réalité biologique. Ceci suppose deux conditions :

- L'indicateur a le même devenir métabolique que l'isotope naturel.

- L'introduction de l'indicateur ne perturbe pas le métabolisme étudié.

Si ces deux postulats sont respectés, les molécules marquées ont la même probabilité de renouvellement que les molécules non marquées.

Pour un composé marqué par un isotope radioactif, on peut définir une radioactivité spécifique (R.A.S). C'est le support du nombre d'atomes radioactifs au nombre total d'atomes d'un élément donné.

La méthode des indicateurs appliquée à l'étude des systèmes biologiques a suscité un grand nombre de travaux.

Le mode d'administration de la substance marquée a une importance fondamentale.

Deux cas sont envisagés :

- L'administration unique
- L'administration continue

1. Administration unique de l'indicateur

1.1 - La dilution isotopique

a) Cinétique de la distribution dans un seul compartiment en état stationnaire

La dynamique d'un tel système s'exprime par la vitesse d'apparition et de disparition des molécules du constituant à déterminer. Faibles, ces vitesses peuvent être négligées pendant la durée de l'observation, le système est dit "fermé".

Dans un tel compartiment M, on introduit rapidement, en une seule injection, une radioactivité R^*. Après dilution, la courbe de la radioactivité spécifique tend vers une valeur d'équilibre. La détermination de la radioactivité r sur un échantillon de volume v permet de calculer V .

On a $\frac{R^*}{V} = \frac{r}{v}$

d'où $V = \frac{R^*}{r_v}$

r_v est la radioactivité volumique de l'échantillon prélevé. On mesure ainsi l'eau totale du corps, considérée comme un compartiment unique vis à vis de l'excrétion.

Dans ce cas, une mC d'eau tritiée est administrée oralement ou par voie intraveineuse. Le mode d'administration choisi est peu important car l'isotope se dilue très vite dans l'eau corporelle. Deux à trois heures plus tard, des échantillons de plasma peuvent être analysés.

La 4-iodo antipyrine marquée à l'iode-131 est également employée. Ce traceur doit être injecté par voie intraveineuse car il est assez rapidement éliminé par les reins.

C'est par la méthode de dilution que l'on détermine le volume sanguin. L'indicateur utilisé est soit un colorant comme le bleu Evans qui se fixe sur les protéines plasmatiques soit une sérum-albumine marquée à l'iode-131. La mesure du volume sanguin se déduit de la connaissance du volume plasmatique et de la valeur de l'hématocrite. Mais le volume des éléments figurés du sang peut être directement déterminé en utilisant des hématies marquées par le chrome-51 par exemple.

Dans le cas d'un indicateur coloré, de concentration connue, le volume plasmatique est calculé à partir de la quantité de colorant Q_o introduite dans le compartiment fermé et de la concentration d'équilibre C_{Eq} .

Puisque le volume introduit est très petit par rapport à V on peut écrire :

$$V = \frac{Q_o}{C_{Eq}}$$

b) Cinétique de la distribution dans deux compartiments appliquée à la mesure du sodium échangeable

Lors de la mesure du renouvellement du sodium dans l'organisme on peut négliger l'élimination urinaire et éviter l'absorption si la durée expérimentale est courte /26/.

On pose que :

1) le système est fermé c'est-à-dire que les variations de la R.A.S. de l'indicateur résultent des seuls échanges entre les deux compartiments : plasma et liquide interstitiel.

2) le système est en état stationnaire à l'échelle de temps considéré. Il en résulte nécessairement que les vitesses d'échanges entre les deux compartiments sont égales entre elles.

3) la durée de passage des molécules marquées à travers la barrière compartimentale est négligeable par rapport au temps moyen de séjour dans l'un ou l'autre compartiment.

Dans un tel système, la courbe de radioactivité spécifique de l'indicateur dans le compartiment où il a été introduit est décrite par une fonction exponentielle simple partant d'une valeur initiale maximale et tendant vers une valeur d'équilibre non nulle. Dans le cas du sodium la dilution isotopique permet d'estimer les masses de cet élément contenues dans le plasma et dans le liquide interstitiel.

Les fractions échangeables d'autres éléments de l'organisme tels que le potassium et le chlore ont été mesurées de la même façon.

Cette méthode est encore applicable lorsque le nombre de compartiments est supérieur à deux. Ceci suppose alors une décomposition de la courbe de radioactivité spécifique en une série d'exponentielles.

1.2 - Le principe d'occupation

Un système ouvert, en équilibre stationnaire peut être étudié sans tenir compte de la distribution compartimentale.

La notion d'occupation est complémentaire de celle de renouvellement et entre dans le cadre de la théorie de BERGNER. Précisée par ORR et GILLESPIE en 1968 /48 et 80/, elle a été généralisée par KELLERSHOHN /66/.

Selon ces auteurs, le principe d'occupation définit la relation entre trois paramètres fondamentaux d'un système biologique à l'état stationnaire dans lequel on introduit l'indicateur.

- l'occupation d'une partie ou de tout le système est définie comme étant l'intégrale par rapport au temps de la fraction de l'indicateur qui se trouve dans cette partie ou dans tout le système :

$$\theta = \int_0^\infty ft \, dt$$

Cette intégrale n'est autre que la surface engendrée par la courbe de la radioactivité en fonction du temps de l'indicateur.

- la capacité (C) est la quantité de substance mère dans une partie définie ou dans tout le système.

- le flux (F) est la quantité constante de substance mère entrant dans le système par unité de temps.

On en déduit que le rapport de l'occupation à la capacité est le même dans toutes les parties du système considéré. Il est égal à l'inverse du flux.

$$\frac{\theta_1}{C_1} = \frac{\theta_2}{C_2} = \frac{\theta_n}{C_n} = \frac{1}{F}$$

La mesure de l'occupation s'obtient en injectant une quantité connue d'un indicateur dans le système à un instant donné t. On suit la variation de cette quantité qui se trouve dans une partie connue du système du temps t jusqu'à un temps infini.

On peut extrapoler à un temps infini la courbe obtenue expérimentalement pendant un temps donné. L'erreur sera plus petite par rapport à celle mesurée expérimentalement.

Cette méthode a été appliquée à la mesure de la capacité de différents éléments dans l'organisme vivant. Les indicateurs utilisés sont des radioéléments émetteurs σ d'énergie suffisante pour que leur rayonnement ne soit pas absorbé trop fortement par les tissus biologiques.

Les prélèvements de sang ou de liquide biologique sont faits aussi longtemps que possible.

Si θ représente l'occupation de l'organisme et θ_1 l'occupation du liquide biologique ou du sang, la capacité de l'organisme entier est égale à :

$$C = \frac{\theta . c_1}{\theta_1}$$

Les applications, publiées à ce jour, sont peu nombreuses /49-50-88/, nous en citons une à titre d'exemple. (Tableau I.1).

D. COMAR, C. LOCH'H, R. RIVIERE et C. KELLERSHOHN /31/ ont utilisé le principe d'occupation pour mesurer la diète quotidienne et le contenu total de l'organisme en rubidium stable chez quatre sujets normaux. La radioactivité du corps entier et la radioactivité spécifique du rubidium salivaire ont été mesurées pendant un à trois mois. De plus, chez un des sujets la diète quotidienne ainsi que l'élimination urinaire et fécale du rubidium ont été estimées par radioactivation neutronique. Connaissant la concentration salivaire du rubidium stable (C') la capacité totale du rubidium dans l'organisme (C) est donnée par la relation :

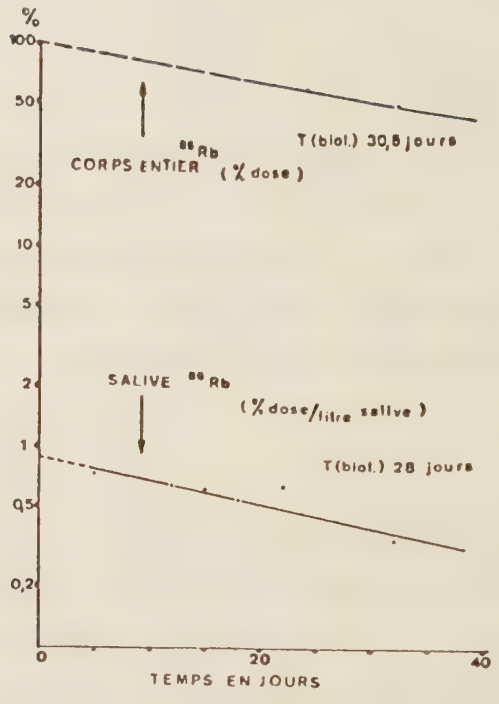
$$\frac{\theta}{C} = \frac{\theta'}{C'} = \frac{1}{F}$$

F représente la diète quotidienne. Les résultats obtenus pour un sujet sont groupés dans le tableau I.1.

Certes, on peut objecter que la notion d'occupation ne représente qu'une donnée moyenne de la capacité d'un élément en fonction du temps considéré.

Lorsque l'on considère deux systèmes en état stationnaire, l'un fermé, l'autre ouvert, la dilution isotopique et le principe

Courbes de variation de la radioactivité du rubidium-86 dans le corps entier et la salive chez un sujet normal (sujet n°4) ayant reçu par voie orale une dose indicatrice de 70 µCi de ^{86}Rb.



Estimation de la teneur en rubidium de l'organisme à partir du principe d'occupation chez un sujet normal (sujet n°4).

Occupation de l'organisme (θ_1)	= 43 jours	(compteur sur corps entier)
Occupation salivaire (θ_2)	= 0,35 jour/litre	(cristal puits)
Rubidium salivaire (C_2)	= 1,51 mg/litre	(analyse par activation)
Rubidium dans la diète (F)	= 4,32 mg/jour	(analyse par activation)

Contenu en rubidium de l'organisme

1) $C_1 = F \times \theta_1 = 4,32 \times 43 = 186$ mg

2) $C_1 = \frac{C_2 \times \theta_1}{\theta_2} = \frac{1,51 \times 43}{0,35} = 185$ mg

Tableau I.1 - ETUDE DU METABOLISME DU RUBIDIUM CHEZ L'HOMME NORMAL D'APRES REFERENCE /31/.

d'occupation permettent, dans l'un ou l'autre cas, de mesurer les mêmes grandeurs.

En effet, après une injection unique du traceur, la mesure de la radioactivité spécifique des prélèvements appropriés permet d'écrire :

$$\frac{R}{r} = \frac{C}{c}$$

et $$\frac{\theta}{e} = \frac{C}{c}$$

d'où $$\frac{R}{r} = \frac{C}{c} = \frac{\theta}{e} = \frac{1}{F}$$

Ainsi deux méthodes, différentes dans leur principe, permettent d'obtenir des résultats identiques.

1.3 - Etude des principales voies du métabolisme calcique par la méthode d'AUBERT et MILHAUD

Cette méthode, mise au point en 1959 permet de déterminer l'intensité des différents processus du métabolisme calcique /5 et 6/. Schématisées par les auteurs, les modalités du renouvellement du calcium dans l'organisme sont représentées sur la figure I.1.

La méthode est fondée sur la combinaison des résultats fournis par les bilans classiques et l'interprétation théorique de la courbe de décroissance de la radioactivité spécifique du calcium sérique après une injection intraveineuse de $^{45}CaCl_2$.

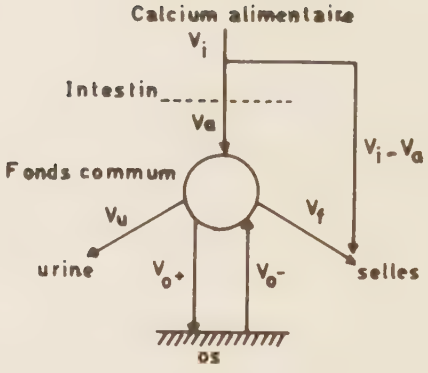
Elle permet de déterminer :

- le taux de l'absorption intestinale du calcium dans l'état chimique où il se trouve dans les aliments,

- la quantité de calcium excrétée par l'intestin en la différenciant de celle non absorbée,

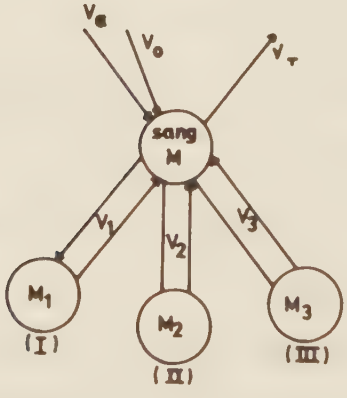
- les vitesses des processus physiologiques de renouvellement du squelette par catabolisme et anabolisme osseux,

- la masse du calcium rapidement échangeable de l'organisme c'est-à-dire le fond commun calcique,



Représentation schématique du métabolisme calcique. Sur cette figure, les différents symboles v définissent des quantités de calcium par unité de temps.

v_i = quantité de calcium ingérée
v_a = quantité de calcium absorbée par l'intestin
v_u = quantité de calcium excrétée par le rein
v_f = quantité de calcium excrétée par l'intestin
v_{o+} = quantité de calcium fixée sur l'os
v_{o-} = quantité de calcium détachée de l'os.



Modèle de décomposition du fond commun calcique en ses constituants.

Figure I.1 - Représentation schématique du métabolisme calcique et modèle de décomposition du fond commun calcique en ses constituants d'après AUBERT et MILHAUD /5 et 6/.

- les vitesses d'échange avec le calcium sérique du calcium de ces différents constituants du fond commun,

- enfin la masse de calcium osseux soumis au phénomène de recristallisation.

Le fond commun est décomposable en trois compartiments dont les constantes de vitesse d'échange avec le calcium sérique sont très différentes.

L'analyse mathématique de la courbe de décroissance de la radioactivité spécifique du calcium sérique ne donne aucun renseignement sur la disposition relative des trois compartiments. Théoriquement un grand nombre de modèles est concevable.

Le modèle de décomposition proposé est représenté sur la figure I.1 . M, M_1, M_2 et M_3 sont les masses de calcium et V_1, V_2 et V_3 les vitesses d'échange. C'est un modèle mammilaire avec réversibilité de transfert entre les compartiments. La quantité de calcium qui entre dans le fond commun V_a et V_{o-} est supposée égale à celle qui en sort.

L'application de la méthode au rat permet de vérifier, expérimentalement, la plupart des hypothèses émises pour établir la théorie.

2. Administration continue de l'indicateur dans un système ouvert en état stationnaire

2.1 - L'équilibre isotopique

Le renouvellement d'un métabolite dans un organisme placé en état stationnaire peut être suivi en fournissant le métabolite précurseur à une radioactivité spécifique constante depuis le temps pris pour origine jusqu'à la fin du renouvellement. A l'équilibre, la radioactivité qui disparaît par unité de temps est égale à celle qui apparaît. Par conséquent, la radioactivité spécifique des molécules du compartiment étudié tend vers une valeur égale à celle de la radioactivité spécifique des molécules exogènes fournies. Ceci à condition que toutes les molécules du métabolite étudié soient

renouvelables. Lorsqu'une partie des molécules est inerte, la radioactivité spécifique du compartiment, à l'équilibre, est encore une constante mais distincte de la radioactivité spécifique de la substance marquée administrée.

De cette méthode dite "d'équilibre isotopique", nous citerons deux applications. Le premier exemple concerne l'état dynamique du cholestérol chez le rat étudié par F. CHEVALIER /24 et 25/.

D'après THOMPSON et BALLOU, une partie du cholestérol chez le rat se renouvelle avec des vitesses extrêmement lentes de l'ordre de l'année ou plus. Le terme d'inertie a été utilisé par les auteurs pour caractériser cette fraction. Cette dénomination est toute relative. Une autre partie participe à un état dynamique. Parmi ces molécules renouvelables certaines sont sujettes à des transferts des organes dans le sérum et vice versa. Elles évoluent dans un espace de transfert, le sérum sanguin y joue le rôle de champ métabolique.

Si le rat ingère quotidiennement une même quantité de cholestérol -4 -^{14}C, la radioactivité spécifique du sérum est constante au bout d'une dizaine de jours. Il s'est donc établi, chez l'animal, un état d'équilibre en cholestérol-^{14}C entre l'ingestion et la disparition du cholestérol-^{14}C ou de ses produits de dégradation. Dans ces conditions, la radioactivité spécifique du cholestérol de l'organisme correspond à la moitié de celle du sérum. Ceci permet de définir "l'espace de transfert" du métabolite étudié.

D'autre part, la radioactivité spécifique du cholestérol sérique, à l'équilibre, n'est pas égale à celle du cholestérol alimentaire. Ceci traduit le mélange permanent du cholestérol radioactif absorbé et déversé dans le sérum par du cholestérol non radioactif synthétisé par l'organisme.

Si M_A et M_S représentent les masses du cholestérol absorbé et synthétisé et R_A et R_S les radioactivités correspondantes, on peut écrire :

$$\frac{M_S + M_A}{M_A} = \frac{R_A}{R_S}$$

On peut donc calculer la quantité de cholestérol synthétisé.

L'espace cholestérol, chez le rat, constitue donc un état dynamique. L'absorption intestinale et la synthèse hépatique, l'excrétion fécale et la transformation en acides biliaires assurent à la fois l'apparition des molécules du cholestérol dans cet espace et leur disparition. Dans cet ensemble, la paroi intestinale est le siège de phénomènes complexes.

- Absorption du cholestérol contenu dans la lumière intestinale que celui-ci provienne des aliments, de la bile ou de la paroi.

- Excrétion du cholestérol sérique dans la lumière intestinale à travers la paroi (m_E).

- Excrétion du cholestérol synthétisé par l'intestin et déversé dans sa lumière.

Si on introduit, d'une façon continue du cholestérol-^{14}C dans l'organisme par voie parentérale, le cholestérol alimentaire et le cholestérol sécrété par l'intestin ne sont pas marqués. La radioactivité apparaissant dans les excréments résultera de la seule excrétion du cholestérol plasmatique. A l'équilibre isotopique la radioactivité du cholestérol plasmatique (r_{Eq}) sera constante de même que la radioactivité fécale journalière (R). Le rapport de ces deux valeurs permettra de calculer la vitesse de l'excrétion m_E

$$\frac{R}{r_{Eq}} = m_E \qquad \text{mg/jr.}$$

Dans ce cas, la lumière intestinale doit être considérée comme un compartiment ouvert mais non stationnaire.

Un autre exemple est fourni par l'étude du métabolisme thyroïdien chez le rat (Claude SIMON /94/).

Ce métabolisme est conditionné en premier lieu par la température ambiante et par l'apport alimentaire. L'état stationnaire résulte de l'adaptation à ces deux facteurs maintenus à une valeur constante.

Pour cela, les animaux placés à une température unique de 23°C, sont alimentés par un régime solide carencé en iode. Leur boisson est une solution d'iodure de potassium dont la concentration

est choisie en fonction de l'apport quotidien d'iode désiré (respectivement 5 et 50 µg d'iode par jour et par animal).

L'expérimentation se déroule en deux temps :

- Etablissement d'un état stationnaire en fournissant la boisson non marquée pendant deux mois.

- Réalisation de l'équilibre isotopique en utilisant une boisson marquée par un traceur à une radioactivité spécifique connue et constante.

En admettant que l'équilibre isotopique était préalablement atteint, pour l'état stationnaire considéré, la variation de la masse renouvelable peut être mesurée en suivant la variation de sa radioactivité à condition, toutefois, que sa radioactivité spécifique reste constante. Il faut pour cela fournir le précurseur à la même radioactivité spécifique que lors de l'établissement de l'équilibre isotopique.

Par double marquage avec de l'iode-125 et de l'iode-131, le renouvellement de tous les composés iodés de la thyroïde peut être suivi : le premier radioisotope étant employé pour doser l'iode à l'équilibre isotopique, le deuxième est alors utilisé comme indicateur cinétique.

Ainsi, in vivo, la méthode d'équilibre a permis de mesurer le contenu en iode de la glande et de calculer l'intensité de la sécrétion sans qu'il soit nécessaire de la prélever. De plus, à l'équilibre, il suffit de diviser la radioactivité d'un compartiment quelconque, mais totalement renouvelable, par la radioactivité spécifique de la substance fournie dans l'eau de boisson pour connaître la masse de cette substance contenue dans le compartiment.

Couramment utilisées, ces méthodes basées sur des injections uniques ou répétées d'"indicateurs" appellent quelques commentaires.

Dans la mesure où les organismes vivants sont soumis à de multiples mécanismes régulateurs qui assurent leur homéostasie, leur caractéristique fondamentale est d'être en état stationnaire. Ce sont donc des systèmes ouverts. Mais on ne peut parler d'états stationnaire que si, pendant la durée totale d'observation, aucune

variation significative des paramètres qui définissent le système considéré n'est décelable.

La dilution isotopique ne peut donc s'appliquer que dans quelques cas particuliers où l'importance relative de certains paramètres permet de considérer le système envisagé comme fermé.

En outre, une des plus grandes causes d'erreurs vient souvent de l'indicateur lui-même. Il doit être présent et uniformément réparti à l'équilibre dans le compartiment où il est supposé être. Ce n'est pas toujours le cas.

Enfin le mode d'administration de l'indicateur et ses modalités d'injection posent également des problèmes. En effet, dans un compartiment, plusieurs vitesses de renouvellement peuvent coexister. Lorsque l'administration de l'indicateur est unique, seules les molécules renouvelées à la vitesse la plus rapide pourront être marquées. La décroissance de la radioactivité spécifique sera représentée par une seule exponentielle. Si l'administration est continue la cinétique de décroissance, après rupture de l'équilibre, sera alors représentée par une somme d'exponentielles, éventuellement décomposables, en admettant que les vitesses soient très différentes entre elles.

III - L'ANALYSE PAR RADIOACTIVATION NEUTRONIQUE

Des particules chargées ou des radiations électromagnétiques de hautes énergies, susceptibles de modifier la composition du noyau atomique, peuvent être utilisées en analyse par radioactivation. Néanmoins, l'irradiation avec des neutrons est la plus couramment employée.

Les neutrons ont une certaine probabilité d'être capturés par les noyaux des éléments cibles. Dans la plupart des cas, cette capture conduit à la formation d'un noyau radioactif dont la désintégration s'accompagne, souvent, de l'émission d'un rayonnement gamma. Le spectre est composé de raies d'énergies caractéristiques des noyaux émetteurs. Ceci permet d'identifier la présence de certains éléments dans un échantillon. La méthode peut être rendue

quantitative car la radioactivité produite est proportionnelle à la masse irradiée. Une mesure absolue pourrait être faite et le nombre d'atomes présents dans l'échantillon calculé. Mais il est plus commode de rapporter la radioactivité induite par chacun des radioéléments à celle d'un étalon irradié dans les mêmes conditions.

1. Analyses de prélèvements biologiques par radioactivation neutronique

En raison des flux importants fournis par les réacteurs nucléaires, cette méthode prend rang parmi les techniques analytiques les plus sensibles utilisées pour la détection et le dosage des éléments à l'état de trace.

Ainsi il a été montré que le mercure longtemps considéré comme un contaminant, entre dans la composition normale du sang /67/. Mais sa concentration (environ 6 µg/l) se situe bien en dessous des limites de dosage des méthodes conventionnelles d'analyses microchimiques. Il est bien évident qu'une analyse, à des concentrations aussi faibles, ne peut être correctement faite que si tous les réactifs utilisés n'apportent aucune contamination. En analyse par radioactivation ce risque est limité car les réactifs chimiques nécessaires sont, la plupart du temps, introduits après l'irradiation de l'échantillon. De plus, le radioélément peut être dosé sans tenir compte de sa forme chimique ou de son état d'oxydation.

Pour l'étude des processus métaboliques il convient de déterminer à la fois des concentrations et des taux de renouvellement des constituants de l'organisme. Mais l'utilisation des indicateurs est limitée en physiologie humaine par des impératifs dosimétriques. De plus, si la période de l'indicateur nucléaire est trop courte, les informations obtenues seront incomplètes. Ceci peut être, en partie, évité si l'élément dont on désire suivre le métabolisme possède un isotope stable, de faible abondance naturelle, mais qui peut être obtenu à un haut degré d'enrichissement et susceptible d'être utilisé comme indicateur.

2. L'analyse par radioactivation neutronique "in vivo"

Un des aspects les plus attrayants de l'analyse par radioactivation neutronique est son utilisation en analyse non destructive pour estimer la concentration de certains éléments "in vivo".

En effet, dans la mesure où la dose de radiations absorbées au cours de l'irradiation neutronique ne porte pas atteinte à l'intégrité de l'organisme et d'autre part dans la mesure où la détection de la radioactivité induite peut être pratiquée, on réalise les conditions d'une analyse "in vivo" non destructive.

2.1 - Applications en physiologie humaine

C'est à ANDERSON, en 1964, /4/ que l'on doit la première estimation de la composition élémentaire de l'homme par cette méthode. Un volontaire a été irradié avec des neutrons monoénergétiques de 14 MeV émis par une cible tritiée frappée par des deutons de 150 keV. Le sujet était enveloppé dans une couverture de polyéthylène de trois centimètres d'épaisseur destinée à dégrader partiellement l'énergie des neutrons incidents. Après une courte irradiation bilatérale, correspondant à une dose d'environ 0,6 Rem, la radioactivité induite était rapidement mesurée à l'aide d'un ensemble de spectrométrie gamma comprenant un cristal d'iodure de sodium de grande efficacité.

Sur le spectre il a été possible d'identifier les raies caractéristiques du sodium-24 , du chlore-38 et du calcium-49 provenant respectivement des réactions :

$$^{23}Na(n,\gamma)^{24}Na$$

$$^{37}Cl(n,\gamma)^{38}Cl$$

et $$^{48}Ca(n,\gamma)^{49}Ca.$$

De plus, dans la bande d'énergie à 510 keV, la raie émise a été partiellement attribuée à l'azote-13 provenant de la réaction :

$$^{14}N(n,2n)^{13}N.$$

D'autre part, un fantôme de géométrie et de composition aussi proches que possible de celles du corps humain a été irradié dans les mêmes conditions. La comparaison de la radioactivité induite, pour chaque élément, dans le fantôme et le volontaire a permis à ANDERSON de donner la masse totale du sodium et du chlore de l'organisme. En ce qui concerne le calcium, la radioactivité induite, dans la bande d'énergie à 3,1 MeV était trop faible pour permettre une mesure précise.

L'analyse de ce travail permet de mettre en évidence les points suivants :

- Il est possible de déterminer sur l'homme vivant la masse totale d'un certain nombre d'éléments à condition qu'elle soit relativement importante. (Na et Cl : 0,10 % du poids du corps, Ca : 1,5 %, N : 3 %).

En effet, la nécessité de maintenir l'intégrité du système biologique impose des impératifs dosimétriques. Ceci suppose un temps d'irradiation et un flux neutronique aussi faibles que possible. Ne sont donc mis en évidence que les éléments les plus importants de la matrice biologique. Et cependant, il est remarquable de constater que, ni l'oxygène, ni le carbone, ni l'hydrogène qui sont en fait les trois éléments majeurs de l'organisme vivant, ne peuvent être mesurés dans ces conditions.

- Trois sur quatre des radioéléments analysés à savoir : le sodium-24, le chlore-38 et le calcium-49 sont fournis par des réactions de captures neutroniques radiatives, c'est-à-dire par des neutrons de faibles énergies (0,025 eV).

Par contre l'azote-13 provient de l'irradiation de l'azote naturel par des neutrons d'énergie supérieure à 11 MeV. Il faut donc que le spectre énergétique de neutrons soit assez étendu pour permettre ces différentes réactions nucléaires. Connaissant le faible pouvoir de pénétration des neutrons thermiques on peut envisager l'emploi de neutrons, d'énergies plus élevées, qui se thermaliseront partiellement, dans la masse des tissus.

- Rapporter la radioactivité induite dans un sujet humain à celle d'un fantôme de composition chimique connue n'est valable que dans la mesure où l'un et l'autre ont reçu d'une façon homogène

une même quantité de neutrons de même énergie. Malheureusement, la répartition des éléments dans le corps humain n'est pas homogène. Et pour la mesure du calcium, dont 99 % se trouvent concentrés dans le squelette, ce problème est particulièrement aigu. C'est en utilisant d'une part un prémodérateur destiné à ralentir les neutrons incidents et d'autre part une irradiation bilatérale qu'ANDERSON a tenté d'obtenir une meilleure répartition des neutrons thermiques dans l'organisme.

Devant l'intérêt médical potentiel de ces premiers résultats plusieurs groupes de chercheurs ont tenté d'améliorer le protocole opératoire de cette méthode afin de la rendre applicable à la clinique humaine.

a) Homogénéité de l'irradiation

La distribution du flux thermique à l'intérieur du corps est fonction de l'énergie des neutrons incidents, de la distance de l'échantillon à la source neutronique, des modalités d'irradiation, du matériau hydrogéné utilisé comme prémodérateur ainsi que de sa position et de sa distance par rapport au corps. Ceci explique la diversité des techniques employées par différents groupes pour tenter de résoudre ce problème.

En 1968, CHAMBERLAIN et col. /20 et 21/ ont utilisé un cyclotron comme source de neutrons en bombardant une cible épaisse de lithium avec des protons de 10,2 MeV. Le spectre énergétique des neutrons émis s'étendait de 0,1 à 8 MeV et présentait un maximum à 3,5 MeV. Le patient était placé dans une boite de polypropylène de 1,5 centimètre d'épaisseur. Dans ces conditions, la variation du flux thermique dans un fantôme de polyéthylène était de $\pm$ 27 % sur une épaisseur de 20 centimètres.

NELP, PALMER et col. /78/, avec des neutrons de 2 MeV produits par un cyclotron (réaction $^{9}Be(d,n)^{10}B$) ont irradié successivement des cadavres et un fantôme de 25 centimètres d'épaisseur rempli soit d'eau soit d'une solution "équivalent-tissu". Le flux était mesuré avec des détecteurs de manganèse. L'activité induite dans ces détecteurs accusait des variations de $\pm$ 18 % pour le fantôme rempli d'eau sans modérateur, de $\pm$ 20 % pour les

différentes régions du corps et de ± 12 % pour ceux répartis uniquement dans le squelette. Pour améliorer ces résultats, NELP et PALMER ont alors utilisé des récipients remplis d'eau, en métacrylate de méthyle, de différentes épaisseurs pour les membres et un casque de même matériau pour la tête et le cou.

Des irradiations dans la même géométrie, mais avec des neutrons monoénergétiques de 14 MeV, ont permis à ces auteurs d'améliorer l'uniformité du flux thermique. Mais dans ce cas, la radioactivité induite par chacun des radio-éléments issus de réactions n, σ était dix fois plus faible que celle produite par des neutrons thermiques.

Avec des neutrons de 14 MeV et un modérateur constitué par 5 centimètres de paraffine (ou 3,8 centimètres de polyéthylène) placé de part et d'autre d'un fantôme de 23 centimètres d'épaisseur, COHN /27/ a obtenu une homogénéité d'irradiation à ± 5 % pour les neutrons thermiques et à ± 20 % pour les neutrons rapides.

Mais c'est BATTYE /9 et 10/, en 1967, qui a obtenu la meilleure uniformité de flux thermique, (± 3,5 %). Elle a été réalisée avec des neutrons incidents de 14 MeV dans un fantôme de 25 centimètres d'épaisseur, entouré de 3,5 centimètres d'équivalent tissus. Mais, dans ces conditions opératoires la répartition du flux rapide, à l'intérieur du fantôme, était moins homogène.

Dans tous ces travaux des irradiations bilatérales ont été pratiquées. Certes, ceci permet de diminuer le gradient de flux à l'intérieur de l'organisme mais limite les possibilités d'application de la méthode en clinique humaine en posant un problème de confort pour les futurs patients.

C'est à la fois pour pallier cet inconvénient, tout en recherchant la meilleure homogénéité de flux possible, que l'irradiation successive des deux côtés du corps est remplacée par une irradiation simultanée à l'aide soit de sources de neutrons portatives, soit de deux petits générateurs de neutrons.

Ainsi, avec des neutrons d'énergie moyenne de 4,2 MeV émis par quatorze sources de ^{238}Pu-Be (réaction α,n) réparties de part et d'autre d'un fantôme de 25 centimètres d'épaisseur, COHN et col. /29/ font état d'une homogénéité de flux thermique de ± 8 %.

Dans cette expérience, une partie de l'uniformité du flux est due à l'utilisation d'un réflecteur de bismuth qui recouvre toutes les parois de la cellule d'irradiation. Ceci limite considérablement les pertes d'énergie par réflexion des neutrons émis (effet Albedo).

C'est à BODDY /11/ que l'on doit l'utilisation de deux générateurs de neutrons rapides disposés l'un en face de l'autre. Dans ces conditions, les deux côtés du patient, placé sur un lit mobile, sont irradiés d'une façon synchrone. Les premières publications ne mentionnent pas le gradient de flux obtenu. Mais des mesures répétées du calcium total effectuées dans des fantômes, de composition chimique connue, prouvent que les résultats sont reproductibles. En effet, l'écart à la moyenne est de $\pm$ 1,9 %. Des mesures identiques ont été faites, dans un cadavre, par NELP, PALMER et par CHAMBERLAIN. Les écarts à la moyenne sont respectivement de $\pm$ 1,2 % et 3,7 %. Tandis que dans un fantôme, COHN obtient : 2 % /27/.

Lorsqu'on analyse les résultats obtenus par ces différentes techniques on peut conclure que c'est l'emploi des neutrons de hautes énergies (14 MeV) qui permet d'obtenir, à l'intérieur du corps humain une meilleure homogénéité d'irradiation. Néanmoins, ce problème reste encore non résolu (variations de flux thermique de $\pm$ 3,5 à $\pm$ 30 % ; de flux rapide de $\pm$ 3 à $\pm$ 20 %).

Cependant, le choix des neutrons incidents obéit à d'autres impératifs.

b) Dosimétrie.

Le facteur limitant, en clinique humaine, est la dose absorbée par l'organisme au cours de l'irradiation. En première approximation, elle est proportionnelle à l'énergie des neutrons incidents. En fait, la dose délivrée provient de différents mécanismes que l'on peut décomposer comme suit :

- Dose gamma due aux captures radiatives comme la réaction n, σ sur l'hydrogène. Ceci peut être calculé, connaissant le flux thermique en fonction du volume irradié à partir des résultats présentés par H. SLAVENITIS /95/.

- Dose due aux protons de la réaction $^{14}N(n,p)^{14}C$. L'énergie de cette réaction, de l'ordre de 0,63 MeV se partage

entre le proton et le carbone-14. Dans ce cas, la dose absorbée est égale à la dose de première collision.

- Dose due aux protons et aux noyaux de recul produits par les neutrons rapides.

- Dose gamma due au rayonnement émis par les radioéléments induits.

- Dose gamma due au rayonnement direct de l'environnement.

L'étude du spectre énergétique des flux neutroniques permet de connaître la répartition des neutrons en fonction de leur énergie et de déterminer ainsi la dose résultante.

Des doses absorbées par l'organisme, au cours d'irradiations bilatérales, simultanées ou successives, pratiquées avec différentes sources de neutrons sont données dans le tableau I.2.

Ces résultats montrent que ce sont les sources de neutrons dites isotopiques qui délivrent les doses les plus faibles (environ 0,3 rem). Elles ont, en plus, le grand avantage d'être beaucoup plus commodes d'emploi.

c) Autres possibilités de dosage

Depuis les travaux d'ANDERSON, un certain nombre d'éléments, entrant dans la composition corporelle, ont été détectés et mesurés. Avec des neutrons incidents de 14 MeV, partiellement thermalisés par 3,8 centimètres de polyéthylène, COHN et son équipe /28/ ont dosé, chez dix-sept malades, avec le calcium, le sodium et le chlore, l'azote et le phosphore. L'homogénéité d'irradiation, dans ces conditions expérimentales, était de $\pm$ 5 % pour le flux de neutrons thermiques et de $\pm$ 20 % pour le flux de neutrons rapides. Les résultats obtenus pour l'azote sont élevés par rapport à ceux fournis par l'I.C.R.P. (International Commission on Radiological Protection) à partir d'analyses chimiques de cadavres. Par contre, les valeurs trouvées pour le calcium et le phosphore sont plus basses. Les teneurs en chlore et sodium sont voisines de celles annoncées dans les travaux antérieurs.

Source de neutrons	Energie des neutrons incidents(MeV)	Temps d'irradiation total (minutes)	Dose totale absorbée (rem)	Référence
Générateur (Cockcroft-Walton)	14	4-7	0,6	ANDERSON /4/
Générateur (Texas-Nuclear)	14	5	0,04	COHN /27/
Générateur	14	15	1,5	BATTYE /10/
Cyclotron	4-12	1	2,1	NELP et PALMER /78/
Cyclotron	3,5	5	1,8	CHAMBERLAIN /21/
Cyclotron	6	10	2,2	GUEY /53/
Sources portatives de ^{238}Pu-Be	4,2	5	0,28	COHN /29/

Tableau I.2 - DOSES ABSORBEES AU COURS D'IRRADIATIONS BILATERALES PRATIQUEES AVEC DIFFERENTES SOURCES DE NEUTRONS.

Une autre méthode d'analyse élémentaire "in vivo" consiste à utiliser, non pas le rayonnement gamma des radioisotopes résultant de l'activation neutronique, mais les gammas de capture caractéristiques de chaque élément produit au cours de la réaction (n,γ) elle-même. Cette méthode a été utilisée pour la première fois par RUNDO et BUNCE /91/ et plus récemment par CARLMARK et REIZENSTEIN /17/ pour apprécier la quantité totale d'hydrogène de l'organisme humain grâce à la raie de capture unique et très intense de cet élément à 2,23 MeV. Les neutrons sont émis par deux sources isotopiques de dix mCi d'Américium-Bérylium, la dose de radiations absorbée est très faible (3 mrem). Pour permettre une bonne détection des gammas de capture de l'hydrogène, pendant l'irradiation, un blindage composé d'un mélange bore et paraffine entoure les sources.

La méthode a été également appliquée au dosage de l'azote total de l'organisme humain par CHAMBERLAIN /22/. La raie des gammas de capture de l'azote a le grand avantage d'être située dans une bande d'énergie élevée (10,8 MeV) où il n'existe aucune interférence. Des pulses de neutrons, émis par un cyclotron, sont fixés à dix microsecondes. La détection et le comptage sont pratiqués durant les quelques cent microsecondes pendant lesquelles les neutrons sont thermalisés et capturés à l'intérieur du corps. La précision de cette méthode, mesurée sur des cadavres, est de $\pm$1à2% et la dose de radiations est comparable à celle qui est délivrée avec des neutrons incidents de 14 MeV.

d) Problème posé par les interférences

En raison de la complexité du spectre neutronique, des réactions nucléaires sur des éléments distincts peuvent conduire à la formation d'un même radioélément et être la cause de résultats erronés.

La principale interférence rencontrée dans la détermination du calcium-49 est celle du soufre-37 [$^{37}Cl(n,p)^{37}S$. Seuil de la réaction : 3,5 MeV]. La contribution du soufre-37 à l'activité induite à 3,1 MeV par le calcium-49 a été étudiée par plusieurs auteurs. Elle est :

- avec des neutrons incidents de 14 MeV ;
  - de 13 % pour BATTYE
  - de 6 et 1,4 % pour COHN et DOMBROWSKI,

lorsque la détection du calcium-49 est faite six et vingt trois minutes après la fin de l'irradiation.

- Avec des neutrons de plus faibles énergies, produits par un cyclotron ;
  - de 2,7 % pour NELP (spectre de neutrons allant de 4 à 12 MeV).
  - nulle pour CHAMBERLAIN et NEWTON qui ont respectivement utilisé des neutrons de 3,5 et 5 MeV.

Les variations de la section efficace de la réaction (n,p) en fonction de l'énergie de la particule incidente, les différentes modalités d'irradiation employées ainsi que les diverses concentrations en chlore dans le fantôme utilisé n'expliquent pas complètement la disparité des résultats.

La réaction $^{24}Mg(n,p)^{24}Na$ (seuil 4,7 MeV) peut interférer dans la détermination du sodium-24.

- Avec des neutrons incidents de 14 MeV elle est ;
  - de 3,4 % pour BATTYE
  - de 44 % pour PALMER
  - nulle pour COHN et DOMBROWSKI.

- d'environ 0,3 % avec des neutrons de plus faibles énergies.

La valeur élevée trouvée par PALMER est presque certainement imputable à l'utilisation de neutrons rapides non thermalisés.

La mesure du chlore peut être faussée par l'interférence provoquée par la présence du potassium dans l'échantillon [réactions: $^{39}K(n,2n)^{38m}K$ et $^{41}K(n,\alpha)^{38}Cl$]. BATTYE est le seul à penser que le potassium-38^m peut augmenter de 4 % , dans la bande d'énergie 2,16 MeV, l'activité induite par le chlore-38.

Une interférence est également mentionnée par BATTYE comme susceptible de fausser le dosage de l'azote. Il s'agit de la réaction : $^{31}p(n,2n)^{30}p$.

Elle est estimée à 12 %, dix minutes après la fin de l'irradiation. Mais la période du phosphore-30 étant relativement courte (2,56 minutes), un temps de refroidissement de vingt minutes suffit pour la négliger.

e) Modalités de détection de la radioactivité induite

La validité de la méthode d'analyse par radioactivation neutronique est également liée à l'efficacité de la détection des radioéléments induits. Lorsqu'une grande efficacité est requise, on emploie généralement des détecteurs à scintillation munis de cristaux d'iodure de sodium. Mais cette sensibilité est liée au volume et au nombre de détecteurs utilisés. Ce volume total peut varier de 4 689 cm^3 (4 détecteurs de 12 cm x 10 cm) à 50 000 cm^3 (54 détecteurs de 15 cm x 5). Lorsqu'un grand pouvoir de résolution est exigé, ce qui est le cas pour l'analyse des spectres de gammas de capture où les raies caractéristiques des éléments sont très nombreuses, des spectromètres germanium-lithium sont alors indispensables.

En dépit des problèmes posés par l'analyse par radioactivation, des mesures de la masse corporelle de quelques éléments ont été faites avec une bonne précision. Pour soixante dix kilogrammes de poids, on trouve, dans l'organisme humain, sept kilogrammes d'hydrogène et deux kilogrammes d'azote. Bien que plusieurs groupes aient étudié le chlore total, peu de valeurs absolues ont encore été données. La quantité de sodium trouvée chez un sujet normal est de 70 g/70 kg par ANDERSON et de 80 g/70 kg par CHAMBERLAIN et NELP. C'est une valeur plus faible que celle estimée par l'analyse chimique traditionnelle. Enfin, aucune mesure absolue de la masse calcique corporelle n'a été tentée par CHAMBERLAIN et NELP.

En fait, bien souvent, il est préférable d'étudier, dans une géométrie constante les variations de la radioactivité induite du calcium-49 au cours d'examens répétés. Ceci permet de mettre en évidence de petites variations relatives de la masse du calcium. Ainsi CHAMBERLAIN a adopté une mesure des variations du calcium en fonction de la valeur du rapport $^{49}Ca/^{24}Na$. Le sodium-24 est ensuite rapporté à la valeur du sodium échangeable qui joue le rôle d'étalon

interne. Malheureusement, la valeur de sodium échangeable est fonction de la valeur du pool sodique, qui peut subir des variations qui ne suivent pas nécessairement celles du pool calcique.

Parallèlement à ces études, portant sur l'ensemble de l'organisme, des expériences d'irradiations localisées ont été tentées. Bien qu'elles se heurtent aux mêmes difficultés, en particulier en ce qui concerne l'homogénéité d'irradiation, elles présentent pourtant, certains avantages. Elles peuvent soit mettre en évidence des rapports de masse de certains éléments, soit à partir d'un site privilégié refléter les modifications de la composition corporelle dans certains états pathologiques. D'autre part, lorsqu' un élément se trouve presque entièrement concentré dans un organe, il est alors inutile d'analyser l'organisme entier.

A première vue, il paraît impossible d'irradier d'une façon homogène et de définir parfaitement un site d'irradiation comme un organe. Par contre, on peut mesurer des rapports de masse de un ou plusieurs éléments à condition que leur répartition dans l'échantillon soit uniforme. Ainsi l'irradiation d'une petite surface du tibia a permis à COMAR et col. /30 et 30 bis/ d'estimer les rapports Ca/Na et Ca/Cl et de doser le phosphore par la mesure des gammas de désintégration et de capture (phosphore). Des comptages répétés de la radioactivité induite ont également permis de confirmer que la moitié du sodium osseux est échangeable. Le dispositif d'irradiation utilisé est un guide courbe dans lequel les neutrons, qui ont une longueur d'onde comprise entre 0,8 et 40 Angströms, subissent une réflexion totale. Ainsi le flux de neutrons venant du réacteur (EL_3 à Saclay) est, à la sortie du guide, dépourvu de neutrons rapides. Le pouvoir de pénétration de neutrons d'aussi faibles énergies est très réduit. Mais la couche de tissus qui recouvre le tibia est mince. Aussi, durant l'irradiation seuls les constituants minéraux de la partie superficielle de l'os deviennent radioactifs.

La détection "in vivo" de l'iode dans la thyroïde est un autre exemple d'analyse par radioaction localisée. Chez les sujets normaux, cette glande de faible volume (30 cm^3), contient la plus grande partie de l'iode corporel (10 mg). Du fait de la grande absorption des neutrons par les tissus biologiques et des inévitables

différences entre la géométrie d'irradiation et de comptage, les conditions requises pour des mesures valables sont très difficiles à obtenir. Pour cette étude BODDY /12/ a utilisé les neutrons d'un réacteur. Les investigations tentées sur vingt huit patients ont montré, qu'après collimation, le faisceau des neutrons, partiellement filtré par du bore, permettait une uniformité d'irradiation acceptable. BODDY estime, qu'en tenant compte des erreurs systématiques imputables à l'irradiation et à la géométrie, la précision est de 15 %.

2.2 - L'expérimentation animale

Apprécier la précision et la portée de la méthode, chez l'homme, présentent des difficultés. Dans ce domaine, l'expérimentation animale offre de plus larges possibilités. En effet, les impératifs dosimétriques sont moins stricts et l'étude peut être faite sur un plus grand nombre de sujets. Un certain nombre de mises au point ont donc été tentées.

Des irradiations de dix minutes ont permis à NAGAI/77/ de déterminer l'azote et les protéines contenus dans dix souris (flux de neutrons de 14 MeV de l'ordre de 5.10^{10} $n/cm^{-2}/s^{-1}$). La radioactivité induite dans les animaux et dans des fantômes de polyéthylène (contenant 20 ml d'une solution de NH_4NO_3 à concentration croissante) était mesurée pendant deux cents secondes après soixante secondes de refroidissement. Pour vérifier que la méthode pouvait être utilisée à la détermination des protéines, des fantômes contenant des solutions de sérum-albumine furent également irradiés. Sept de ces animaux ont été sacrifiés et analysés ainsi que les solutions de sérum-albumine selon les méthodes chimiques traditionnelles. Les résultats obtenus par ces deux méthodes étaient reproductifs.

En 1970, WILLIAMS /109/ a dosé le phosphore contenu dans vingt et une souris. Chaque animal, sacrifié avant l'irradiation, était enfermé dans des conteneurs remplis d'eau et irradié simultanément avec un fantôme de composition chimique connue. L'ensemble échantillon-standard était placé sur un plateau tournant dans l'axe d'un faisceau de neutrons monoénergétiques de 14 MeV. Les résultats ont également été vérifiés par l'analyse chimique destructive.

Pour étudier le problème posé par l'hétérogénéité de l'irradiation, LENIHAN et col. /70/ ont utilisé l'iode-129 comme étalon interne au cours de la mesure de l'iode thyroïdien du mouton. L'injection d'iode-129 (2 mg), dont la quantité fixée par la glande thyroïde a été mesurée, est supposée se distribuer de la même manière que l'iode-127.

A la fin de l'irradiation, par un faisceau de neutrons thermiques, les radioactivités induites de l'iode-130 et de l'iode-128 sont mesurées dans l'animal et dans un standard contenant des quantités connues d'iode-127 et d'iode-129. Dans ces conditions, l'iode-127 thyroïdien a pu être dosé avec une bonne précision.

Une méthode originale de détection du calcium total chez le chien et le rat a été mise au point, très récemment par PALMER /82/. Durant l'irradiation du squelette avec des neutrons de 14 MeV, une petite quantité du calcium est converti en Argon par la réaction $^{40}Ca(n,\alpha)^{37}Ar$. PALMER a observé que l'argon radioactif, produit au niveau de la matrice osseuse, est éliminé en presque totalité par la voie respiratoire et peut donc être récupéré. En substituant à l'air inspiré par l'animal un mélange gazeux d'hélium à 80 % et d'oxygène à 20 %, la séparation de l'argon de l'oxygène, de l'oxyde de carbone et de la vapeur d'eau est plus aisée. L'argon collecté peut alors être transféré dans un compteur à gaz proportionnel et mesuré. Il faut environ une heure chez le rat et une heure et demie chez le chien pour que plus de 95 % de l'argon formé au niveau du squelette aient été expirés.

En fait, ces travaux sur l'animal n'ont pas fait l'objet jusqu'à présent d'études systématiques et d'applications en physiologie.

Le but de ce présent travail est de montrer que l'analyse par radioactivation neutronique "in vivo" sur le rat permet de déterminer au moins quatre éléments, de répéter ces mesures au cours du développement et d'en déduire les modifications de la composition élémentaire de l'animal en fonction de l'âge et des principaux évènements de la vie biologique dont la reproduction sera prise comme exemple.

Nous envisagerons successivement :

- la description de la méthode mise au point.
- la validité des résultats en les comparant à ceux obtenus par l'analyse chimique destructive.
- l'évolution des concentrations en fonction de l'âge.
- enfin l'incidence d'irradiations répétées sur l'intégrité de l'animal.

C H A P I T R E II

METHODE ET TECHNIQUES

I - METHODE

1. Généralités sur l'analyse par activation

PRINCIPE :

L'analyse par activation consiste à irradier les isotopes stables de l'élément à analyser dans un flux de particules : neutrons, particules chargées ou même photons. On mesure ensuite l'activité des isotopes radioactifs de l'élément à doser formés par cette irradiation.

L'activation "nucléaire" ne concernant que le noyau de l'isotope, l'activité de l'élément est indépendante de sa forme chimique, elle est d'autre part proportionnelle au nombre de noyaux, c'est-à-dire à sa masse.

L'analyse par activation peut donc servir à deux buts :

- une analyse qualitative par identification des éléments grâce aux caractéristiques nucléaires des isotopes radioactifs de l'élément : périodes et énergies des rayonnements émis,

- une analyse quantitative par dosage des éléments grâce à la relation de proportionnalité entre la masse de l'élément irradié et son activité nucléaire.

FORMULE GENERALE D'ACTIVATION :

Cette proportionnalité entre l'activité et la masse de l'élément irradié est une relation de base de l'analyse par activation.

La décroissance radioactive est un phénomène statistique, chaque noyau ayant une probabilité λ de désintégration par unité de temps, le nombre de noyaux qui se désintègrent par seconde est proportionnel à λ et au nombre de noyaux N excités :

$$\frac{dN}{dt} = -\lambda N \qquad N = No\ e^{-\lambda t}$$

No étant le nombre de noyaux excités à l'instant $t = 0$.

La période T, temps pendant lequel le nombre de noyaux radioactifs a diminué de moitié, caractérise le radioélément :

$$T = \frac{\text{Log } 2}{\lambda}$$

Supposons que l'élément A est bombardé par des particules a et que la réaction nucléaire crée le radioisotope B de période Tb et la particule associée b , que B décroit en émettant un rayonnement caractéristique :

$$A + a \rightarrow B + b$$

Le nombre N de noyaux A est maintenu presque constant si la section efficace de la réaction A (a,b) B n'est pas grande et si l'irradiation ne dure pas très longtemps.

Le nombre $N_B(t)$ de noyaux B qui décroit, avec une constante de décroissance, λ_B , pendant le temps dt est égal à :

$$N_B(t)\ \lambda_B\ dt$$

Le nombre de noyaux activés par unité de temps est proportionnel au flux de neutrons ϕ , à la section efficace de réaction σ , au nombre n_A de noyaux stables, à l'abondance isotopique Θ de A dans l'élément. Au total le nombre de noyaux B augmente de :

$$dN_B(t) = N_A \sigma \phi\ dt - \lambda_B\ N_B(t)\ dt$$

$$\frac{dN_B(t)}{dt} + \lambda_B\ N_B(t) - N_A\ \sigma\ \phi = 0$$

N_B (t=0) = 0 et pour une irradiation qui dure un temps t_i =

$$N_B(t) = \frac{N_A \sigma \phi}{B} \quad (1-e^{-\lambda_B t_i})$$

L'activité est égale à :

$$A_{(t)} = N_B(t) \lambda_B = N_A \sigma \phi \quad (1-e^{-\lambda_B t_i})$$

$$N_A = \frac{N \theta m}{M}$$

N = nombre d'Avogadro
M = masse atomique de l'élément irradié en g
m = masse de l'élément irradié en g
σ = section efficace en cm^2
ϕ = flux en neutrons/cm^2/s

$$A_{(t)} = \frac{m}{M} \sigma \phi N \theta \ (1-e^{-\lambda_B t_i})$$

APPLICATION A L'ANALYSE :

Pour déterminer la quantité d'élément présente dans l'échantillon, on peut rarement appliquer directement cette relation absolue entre l'activité A_t et la masse m de l'élément : les valeurs des paramètres σ et ϕ ne sont connues qu'avec une précision très inférieure à celle que l'on veut obtenir dans la détermination de m .

La difficulté est tournée par une expérience simultanée : on irradie en même temps et dans les mêmes conditions l'échantillon E et un témoin T de masse connue de l'élément que l'on veut doser :

$$A_{tE} = m_E \sigma \phi \ \frac{N.\theta}{M} \ (1-e^{-\lambda_B t_i})$$

$$A_{tT} = m_T \sigma \phi \ \frac{N.\theta}{M} \ (1-e^{-\lambda_B t_i})$$

m_E = masse de l'élément dans l'échantillon
m_T = masse de l'élément dans le témoin
A_{tE} = activité en fin d'irradiation dans l'échantillon
A_{tT} = activité en fin d'irradiation dans le témoin.

$$\frac{A_{tE}}{A_{tT}} = \frac{m_E}{m_T} \qquad m_E = m_T \frac{A_{tE}}{A_{tT}}$$

A_t représente une activité en fin d'irradiation. Après l'irradiation, l'activité de B décroît exponentiellement. Après un temps de refroidissement T_r, l'activité de B deviendra A_t :

$$A_{t_r} = A_t . e^{-\lambda_B T_r} = m \sigma \phi \frac{N.0}{M} (1-e^{-\lambda_B t_i}) e^{-\lambda_B T_r}$$

L'activité de l'échantillon et du témoin n'est souvent pas mesurée au même instant ; pour les comparer il faut donc faire intervenir une correction de décroissance afin d'établir la relation de proportionnalité au même instant.

Si le temps d'irradiation tend vers l'infini l'activité A_t tend vers la saturation A_s et l'expression :

$$1-e^{-0,693\ t_i/T} \rightarrow 1$$

$$A_s = m \sigma \phi \frac{N.\theta}{M}$$

Si σ est exprimé en barns (1 barn = 10^{-24} cm^2)

$$A_s = 0,6 \frac{m}{M} \phi \sigma \theta$$

Si le temps d'irradiation $t_i = T$ est la période du radioisotope formé

$$1-e^{-0,693 \frac{T}{T}} = 0,5$$

$$A_{1/2} = 0,3 \frac{m}{M} \phi \sigma \theta$$

Il est donc préférable d'irradier pendant une durée voisine d'une période ; au-delà, l'activité tend vers la limite de saturation et sa valeur ne peut plus être considérée comme proportionnelle au temps d'irradiation.

Dans ce cas, une analyse par activation consiste en :

- des masses à peser
- des activités à mesurer
- des temps à noter pour d'éventuelles corrections de décroissance.

Mais, lorsque l'échantillon et le témoin ne peuvent être irradiés ensemble, il faut ajouter aux paramètres précédents une mesure du flux de neutrons intégré durant l'irradiation. Pour obtenir cette quantité on utilise généralement la mesure de l'activité induite dans un corps irradié en même temps que l'échantillon et que le témoin. La forme, les dimensions, la composition, la position et les modalités de comptage de ces moniteurs doivent être identiques. On peut ainsi normaliser les activités induites dans l'échantillon et le témoin.

On suppose, de plus, que l'échantillon et le témoin occupent des positions identiques pendant l'irradiation et le comptage. On obtient alors :

$$m_E = m_t \frac{AtE}{AtT} \cdot \frac{\Phi T}{\Phi E}$$

2. Caractéristiques physiques des éléments à doser

Les caractéristiques physiques des éléments naturels radioactivables, qui font l'objet de cette étude, sont présentées dans le tableau II.1.

La détection du calcium à partir du ^{44}Ca (2,06 % d'abondance isotopique) par la réaction $^{44}Ca(n,p)^{44}K$ de section efficace = 25 mb , et de période = 22 mn, devait théoriquement pouvoir se faire dans la bande d'énergie 1,13 MeV.

Elle s'est révélée impraticable car la sensibilité est faible et les interférences trop nombreuses dans cette partie du spectre gamma obtenu chez le rat après activation neutronique.

II - MATERIEL

1. Accélérateur-générateur de neutrons de 14 MeV

PRINCIPE :

Il s'agit d'un accélérateur de particules chargées qui produit des réactions génératrices de neutrons rapides. Ces réactions

Isotope naturel	Abondance isotopique	Réaction nucléaire section efficace et période	Seuil de la réaction nucléaire	Principale énergie gamma utilisée pour la détection
^{14}N	99,63 %	$^{14}N(n,2n)^{13}N$ 6 mb ; 10, 3 mn	11,3 MeV	0,511 keV (200 %)
^{31}P	100 %	$^{31}P(n,\alpha)^{28}Al$ 140 mb ; 2,3 mn	2 MeV	1,78 MeV (100 %)
^{48}Ca	0,18 %	$^{48}Ca(n,\gamma)^{49}Ca$ 1,1 b ; 8,9 mn	neutrons thermiques	3,1 MeV (90 %)
^{37}Cl	24,47 %	$^{37}Cl(n,\gamma)^{38}Cl$ 0,56 b ; 37,3 mn	neutrons thermiques	2,17 MeV (47 %) 1,6 MeV (31 %)

Tableau II.1 - CARACTERISTIQUES PHYSIQUES ET ISOTOPES UTILISES POUR L'ACTIVATION NEUTRONIQUE IN VIVO.

neutronigènes ont des seuils assez faibles et sont donc provoquées par des accélérateurs de 100 kV à 500 kV seulement.

Ce type d'appareil est défini par la tension d'accélération des particules chargées, le mode de production des neutrons, le flux et l'énergie des neutrons émis.

CARACTERISTIQUES :

Sur l'accélérateur que nous avons utilisé, la haute tension est fournie par un générateur électrostatique SAMES type Felici et peut atteindre 400 kV pour un courant de 2 mA. Le champ est créé dans le tube accélérateur par des électrodes dont les potentiels décroissent régulièrement de 50 kV, les trois premières focalisant le faisceau.

Un prolongateur, entre le tube d'accélérateur et la cible, supporte un dispositif de contrôle du faisceau qui permet d'en vérifier la géométrie grâce à deux diaphragmes et deux sondes tournantes.

La réaction utilisée le plus couramment est provoquée par l'accélération de deutons qui produisent sur du tritium des neutrons dont la distribution est quasi monoénergétique (Fig. II.1)
(D, T) ou ^{3}H (d,n)^{4}He.

Après extraction de ces ions, la source d'ions se trouvant à haute tension, le faisceau d'ions est focalisé puis accéléré jusqu'au potentiel nul dans le tube accélérateur, le faisceau après contrôle de sa géométrie rencontre alors une cible tritiée et produit un flux de neutrons de 14 MeV.

La cible est un disque plat de cuivre de 49 mm de diamètre refroidi par circulation annulaire d'eau ; une pellicule de quelques microns de Ti (Ø 30) a été déposée sur le cuivre pour absorber le tritium (1 à 4 Ci/cm^2) ; cette cible offre un diamètre utile de 30 mm à l'irradiation. Chaque cible possède un rendement en neutrons qui décroît avec le temps d'utilisation (Fig. II.2 - Ref./52/).

Une cible escamotable cache la cible tritiée hors des phases d'irradiation pendant les réglages de géométrie du faisceau.

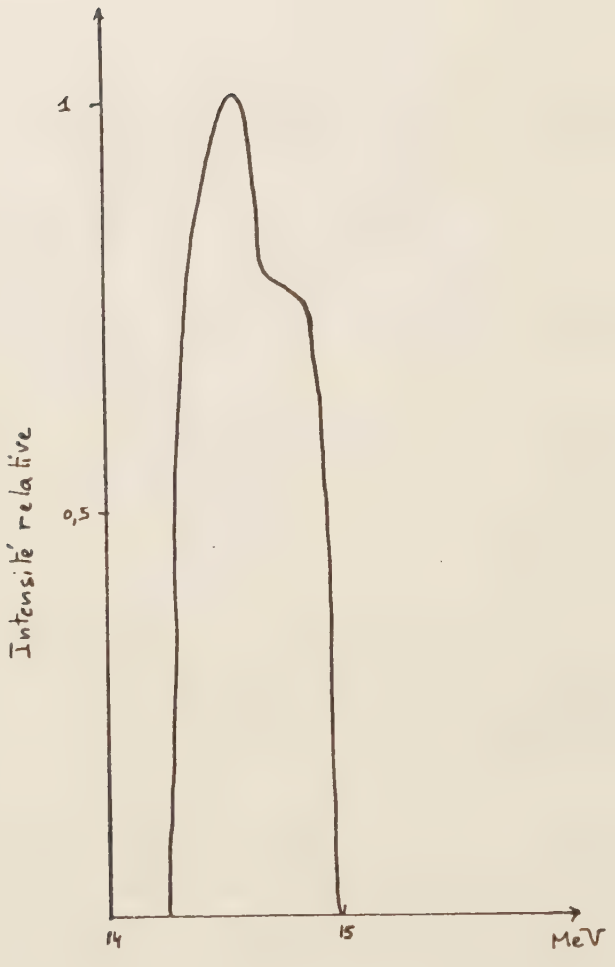


Figure II.1 - Distribution énergétique des neutrons émis par la réaction d,t .

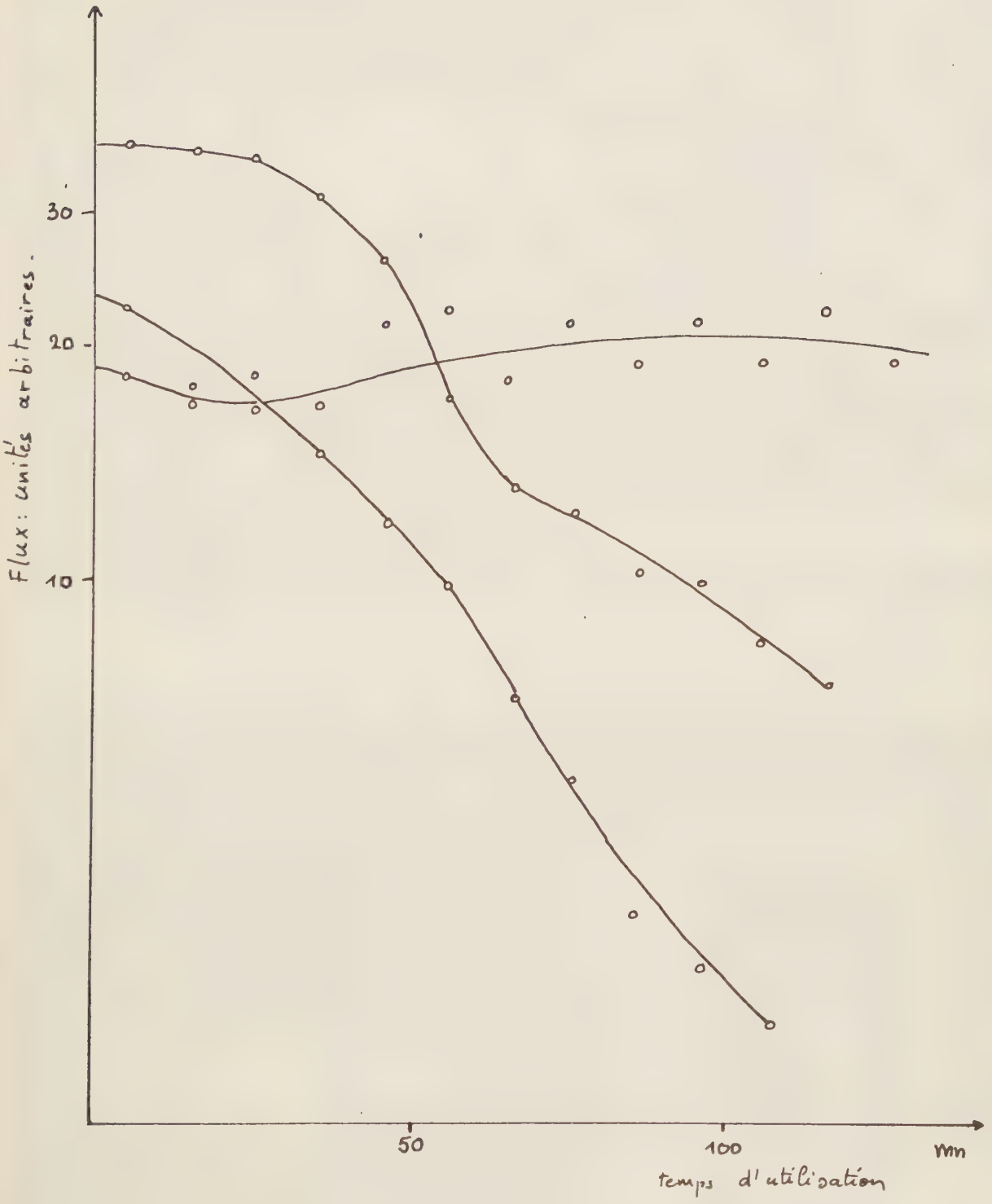


Figure II.2 - Exemples de décroissance du flux à partir de cibles tritiées. (d'après référence /52/).

2. Dispositif d'irradiation tournant

L'homogénéité du faisceau de neutrons fournis par le générateur est fonction de l'homogénéité du faisceau de deutons et de la répartition uniforme du tritium sur la cible. Le faisceau de deutons peut être correctement focalisé sur toute la surface utile de la cible. De plus, la répartition uniforme du tritium doit permettre en chaque point un rendement identique pour la réaction nucléaire de formation des neutrons. En fait, ces conditions ne sont pas parfaitement remplies. Pour corriger les effets de l'anisotropie du flux en fonction de la position et du temps, il faut faire tourner l'échantillon durant l'irradiation parallèlement à l'axe de la cible. D'autre part, les éléments à doser n'étant pas répartis uniformément, l'échantillon doit également tourner sur lui-même.

La combinaison de toutes ces solutions permet d'ajouter les effets de chacune d'elles et c'est pourquoi un dispositif d'irradiation tournant a été réalisé (figure II.3). Les caractéristiques de fonctionnement de cet appareil sont les suivantes :

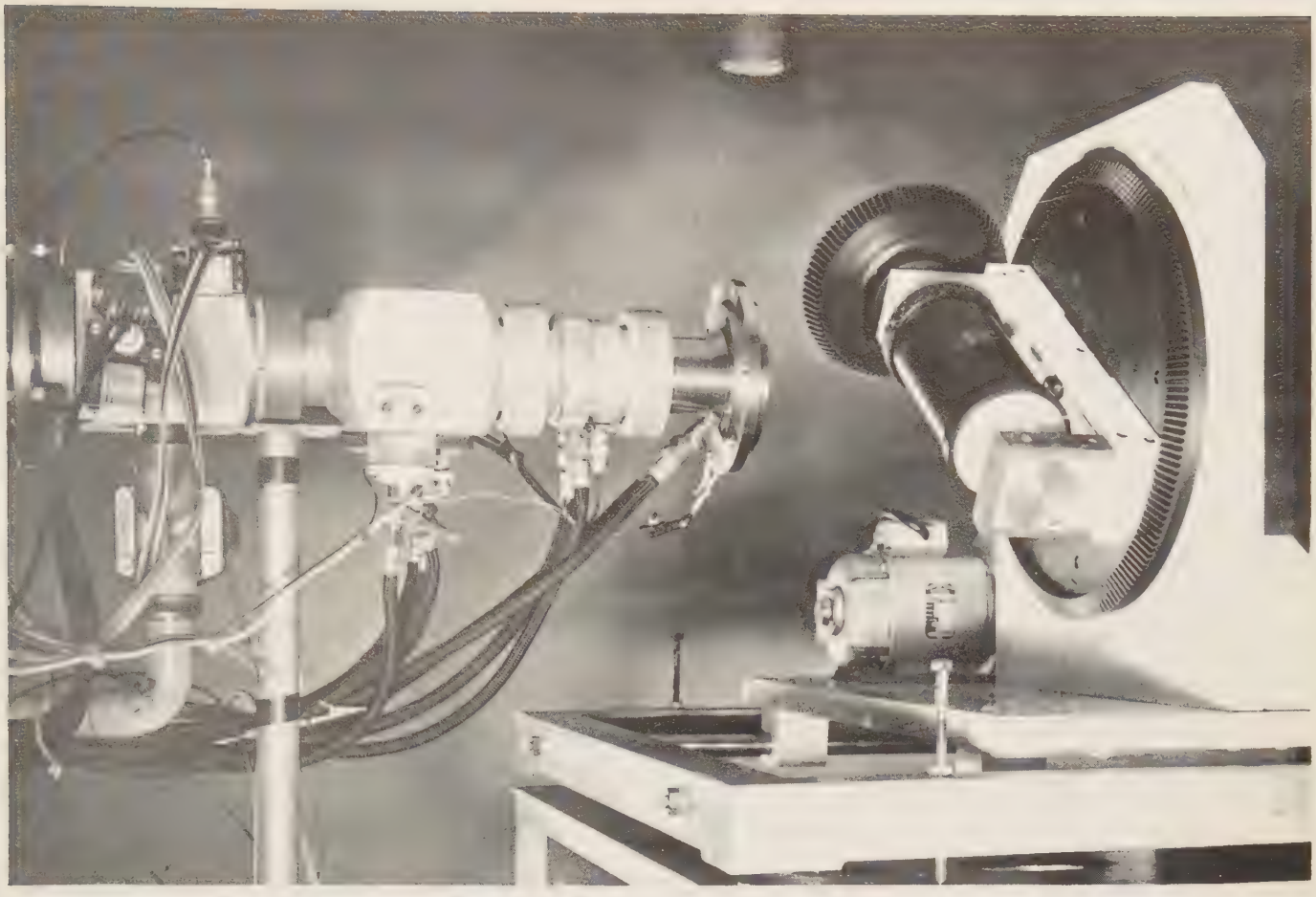
- 10 révolutions par minute sur l'axe parallèle à la cible,
- 20 révolutions par minute sur l'axe de l'échantillon.

Ces vitesses de rotation sont bien tolérées par le rat vivant. La boite cylindrique en chlorure de polyvinyle dans laquelle l'animal est allongé, mesure huit centimètres de diamètre, seize centimètres de longueur. Elle a six millimètres d'épaisseur. La distance de la source à l'échantillon est de quinze centimètres.

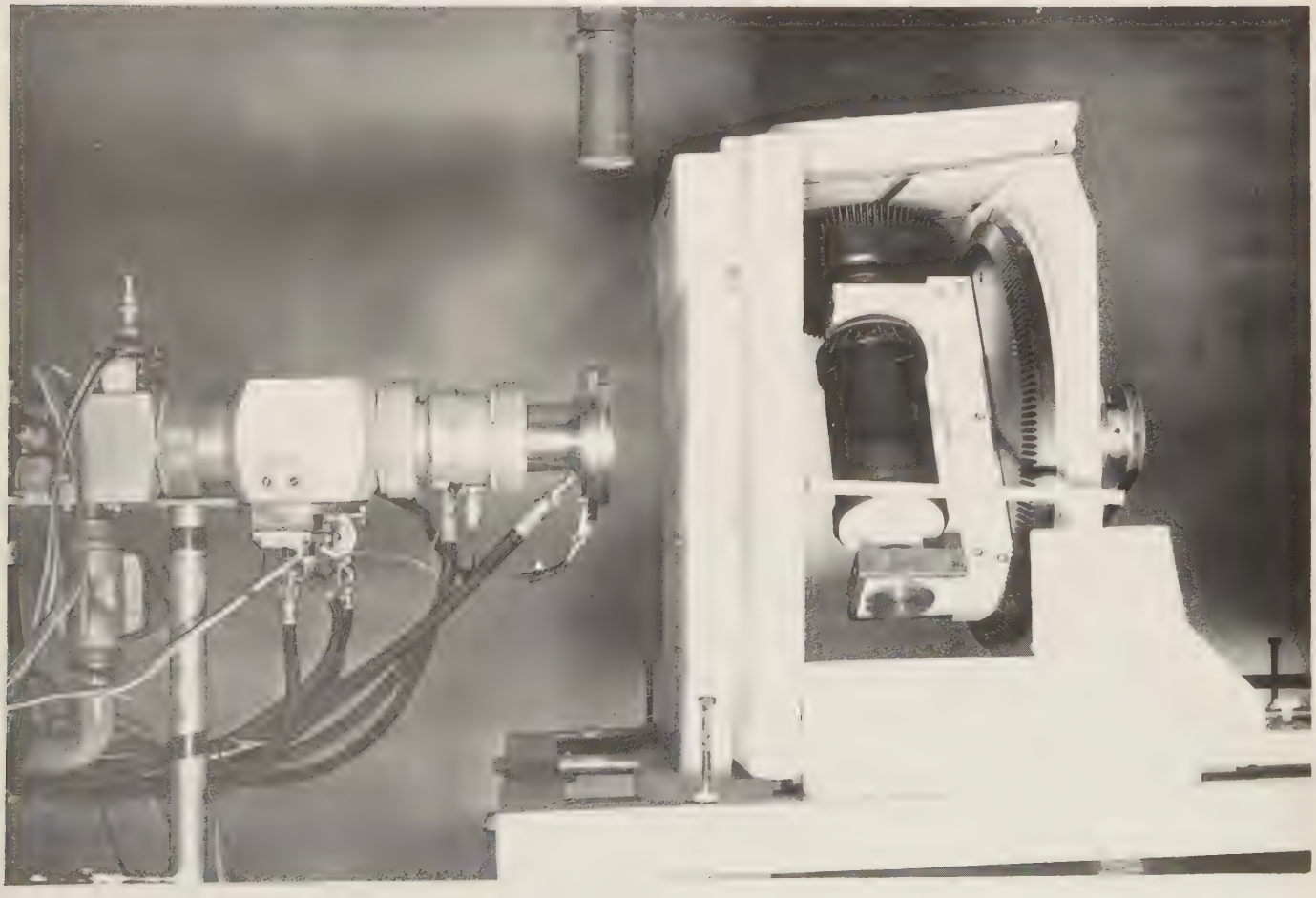
3. Ensemble de comptage en spectrométrie

Un détecteur à scintillation NaI (Tl) transforme le rayonnement gamma ionisant en une impulsion électrique dont l'amplitude est proportionnelle à l'énergie incidente de la particule. Ces impulsions sont traitées par un ensemble électronique qui comporte :

- une amplification linéaire (ensemble préamplificateur-amplificateur).



- DISPOSITIF D'IRRADIATION TOURNANT -



- DISPOSITIF D'IRRADIATION TOURNANT -

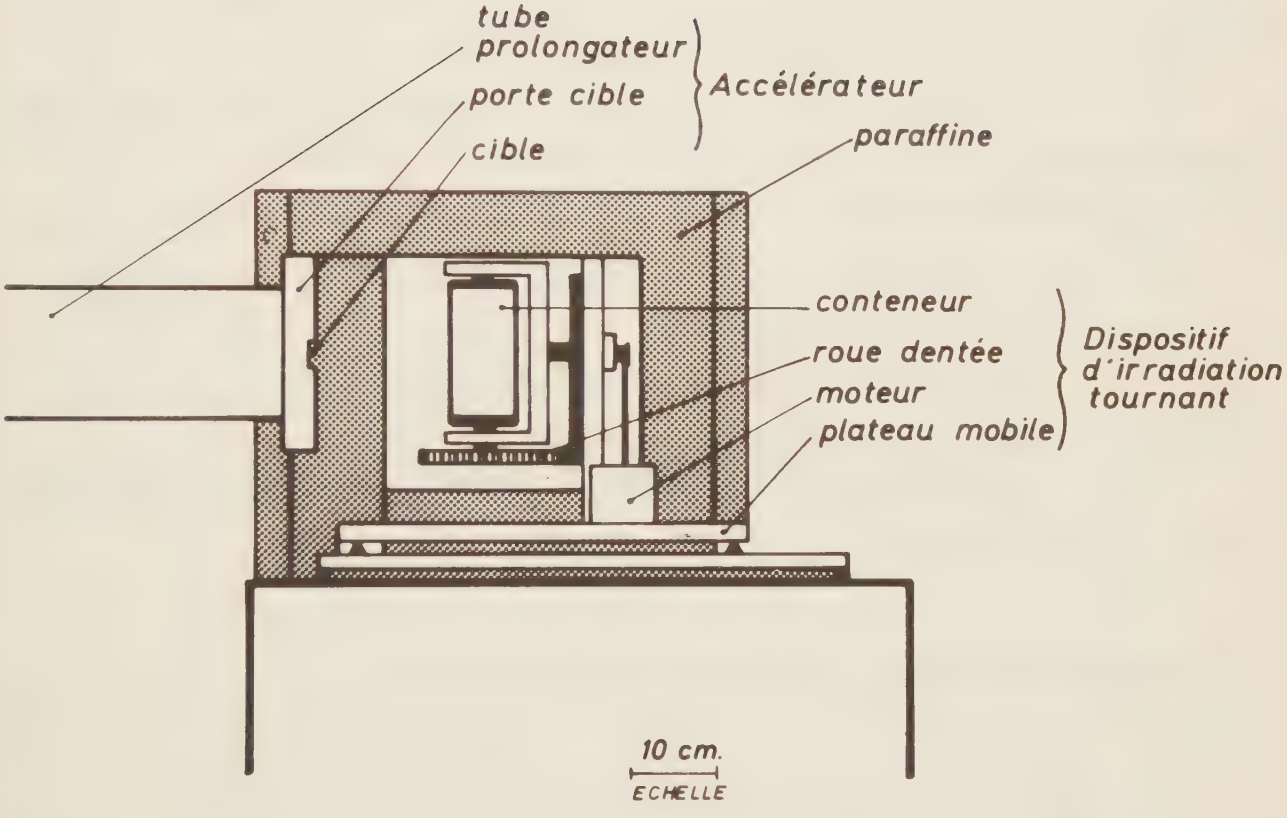


Figure II.3 - Dispositif d'irradiation tournant.

- une échelle de comptage global sur tout ou partie du spectre énergétique ou bien un sélecteur d'amplitude (ou analyseur multicanaux) qui permet de visualiser et de traduire numériquement la courbe de distribution des énergies de l'émetteur gamma.

Efficacité et résolution caractérisent les performances d'un tel détecteur :

- l'efficacité photoélectrique est le rapport entre le nombre d'impulsions sommées sur le photopic et le nombre de gammas émis avec l'énergie du même photopic.

- la résolution est donnée en largeur à mi-hauteur d'un pic photoélectrique pour une énergie donnée et caractérise la finesse de la détection.

Les caractéristiques de l'ensemble de comptage utilisé pour cette étude sont les suivantes :

- un détecteur NaI (Tl) de 12,5 centimètres sur 12,5 centimètres à préamplificateur incorporé.
- un analyseur 400 canaux SA40B . La résolution mesurée sur le pic du césium-137 à 662 keV est de 10 %.

III - ETUDE DU SPECTRE ENERGETIQUE DE NEUTRONS

Pour doser à la fois l'azote, le phosphore, le chlore et le calcium, il faut un spectre énergétique de neutrons très étendu. Dans le cas de l'irradiation d'un sujet humain, connaissant le faible pouvoir de pénétration des neutrons thermiques, on peut envisager l'emploi de neutrons d'énergie plus élevée qui se thermaliseront dans la masse des tissus et permettront une activation relativement homogène du calcium.

Mais le ralentissement partiel des neutrons de 14 MeV dans un animal relativement petit (100 à 400 g) n'est pas suffisant pour permettre la réaction $^{48}Ca(n,\gamma)^{49}Ca$. De plus, le gradient de flux thermique dans un aussi faible volume n'est pas compatible avec des mesures quantitatives précises de radioéléments provenant d'une

réaction n,γ . Il faut donc ralentir partiellement les neutrons en dehors de l'échantillon.

Par approximations successives nous avons déterminé les épaisseurs de ralentisseur permettant d'obtenir un flux maximum de neutrons thermiques dans le conteneur. Ainsi tout le dispositif tournant et le porte-cible sont entourés de plaques de paraffine qui interceptent le faisceau de neutrons incidents sur une épaisseur de sept centimètres.

Pour permettre à la fois :

- la connaissance de la répartition des neutrons de différentes énergies dans le conteneur,
- la comparaison d'échantillons activés dans des conditions identiques mais au cours d'irradiations successives,
- le calcul des doses absorbées par l'animal pendant l'irradiation,

des mesures précises de flux ont été effectuées.

1. Mesure et distribution du flux de neutrons rapides

Le cuivre est utilisé couramment en dosimétrie de flux de neutrons de 14 MeV, pour les raisons suivantes :

- une sensibilité qui permet une bonne statistique de comptage même pour un temps d'irradiation très court.

En effet la section efficace de la réaction nucléaire utilisée : $^{63}Cu(n,2n)^{62}Cu$, est de 560 millibarns. La période du ^{62}Cu émetteur β^+ est de 10 minutes.

- la sensibilité de la réaction $^{65}Cu(n,2n)^{64}Cu$ est négligeable devant la première et permet ainsi des comptages sans interférence durant 30 minutes.

- la courbe d'activation du ^{63}Cu couvre bien la distribution quasi monoénergétique des neutrons de 14 MeV (seuil de la réaction 11,8 MeV).

Un tel dosimètre sert donc de référence d'une irradiation à l'autre. Compté dans des conditions bien précises il permet également de mesurer le flux de neutrons/cm^2/s émis pendant l'irradiation.

Mesure du flux par la méthode de Heath

Un disque de cuivre de 0,12 mm d'épaisseur et de 1 cm de diamètre est placé entre deux écrans de plexiglass (0,95 cm d'épaisseur - 3 cm de diamètre). Les rayons β^+ émis par le cuivre sont ainsi annihilés avant la pénétration dans un cristal NaI(Tl) 76 mm x 76 mm et matérialisés par des gammas de 511 keV. L'ensemble est placé à 3 cm du cristal. On peut alors mesurer l'activité absolue du dosimètre en désintégrations/mn/g de cuivre.

Des corrections sont à faire sur le photopic de 511 keV. La surface corrigée N_o du photopic en coups/s tient compte de la surface N_p non corrigée, du facteur géométrique ε (angle solide), d'une correction A due aux écrans en matière plastique, du pourcentage d'émission K du β^+ :

$$N_o = \frac{N_p}{P.\varepsilon.A.K}$$

P.ε.A.K. = 8,591 dans les conditions données plus haut.

Le flux φ en $n/cm^2/s$ sera donné par :

$$\varphi = \frac{N_p.8,591}{60.\sigma.\theta.N(1-e^{-0,693\ T_i})}$$

$$\text{avec} \quad N = \frac{6,02.10^{23}.P}{63,5}$$

P étant la masse du dosimètre.

Distribution du flux rapide à la surface et à l'intérieur du conteneur

Pour étudier la distribution des neutrons rapides dans un milieu équivalent-rat, le conteneur a été rempli d'un mélange d'eau (67 %) de gélatine (11 %) et de glucose (22 %) (soit 0,73 % - H 11 % - C 16 %).

La répartition a été étudiée de la façon suivante :

- Mesure du gradient de flux absolu (méthode de Heath) à l'aide de disques de cuivre (diamètre : 10mm, épaisseur : 0,12 mm)

placés au centre et à l'extérieur du conteneur dans l'axe du faisceau de neutrons.

- Mesure de la distribution radiale et longitudinale du flux de neutrons rapides à l'intérieur du conteneur avec deux fils de cuivre (diamètre : 1 mm) placés au centre du fantôme et le long d'une génératrice intérieure. Sur une longueur totale de dix centimètres l'activité induite dans la bande d'énergie 511 keV est comptée tous les deux centimètres. Les résultats exprimés en

$$\frac{\text{impulsions/minute à l'instant de fin d'irradiation}}{\text{poids du cuivre en grammes}}$$

sont présentés dans la figure II.4.

2. Mesure et distribution du flux de neutrons thermiques

Des dosimètres de dysprosium ont été employés. La réaction nucléaire utilisée est :

$$^{164}Dy(n,\gamma)^{165}Dy$$ - période : 139 minutes.

La section efficace pour des neutrons de 0,025 eV est de 2 700 barns.

Pour ces raisons, la dosimétrie du flux équivalent aux neutrons de 2 200 m/s a été faite avec des détecteurs du dysprosium (diamètre : 10 mm ; épaisseur : 1,35 mm). L'activité induite après irradiation a été mesurée à l'aide d'un ensemble de comptage étalonné.

Distribution du flux de neutrons thermiques à la surface et à l'intérieur du conteneur

Au cours d'une même irradiation de dix minutes, des dosimètres de cuivre et de dysprosium placés à l'extérieur du conteneur dans l'axe du faisceau de neutrons incidents permettent de déterminer le rapport :

$$\frac{\text{flux thermique}}{\text{flux rapide} > 11{,}8 \text{ MeV}}$$

il a été trouvé égal à 1,5.

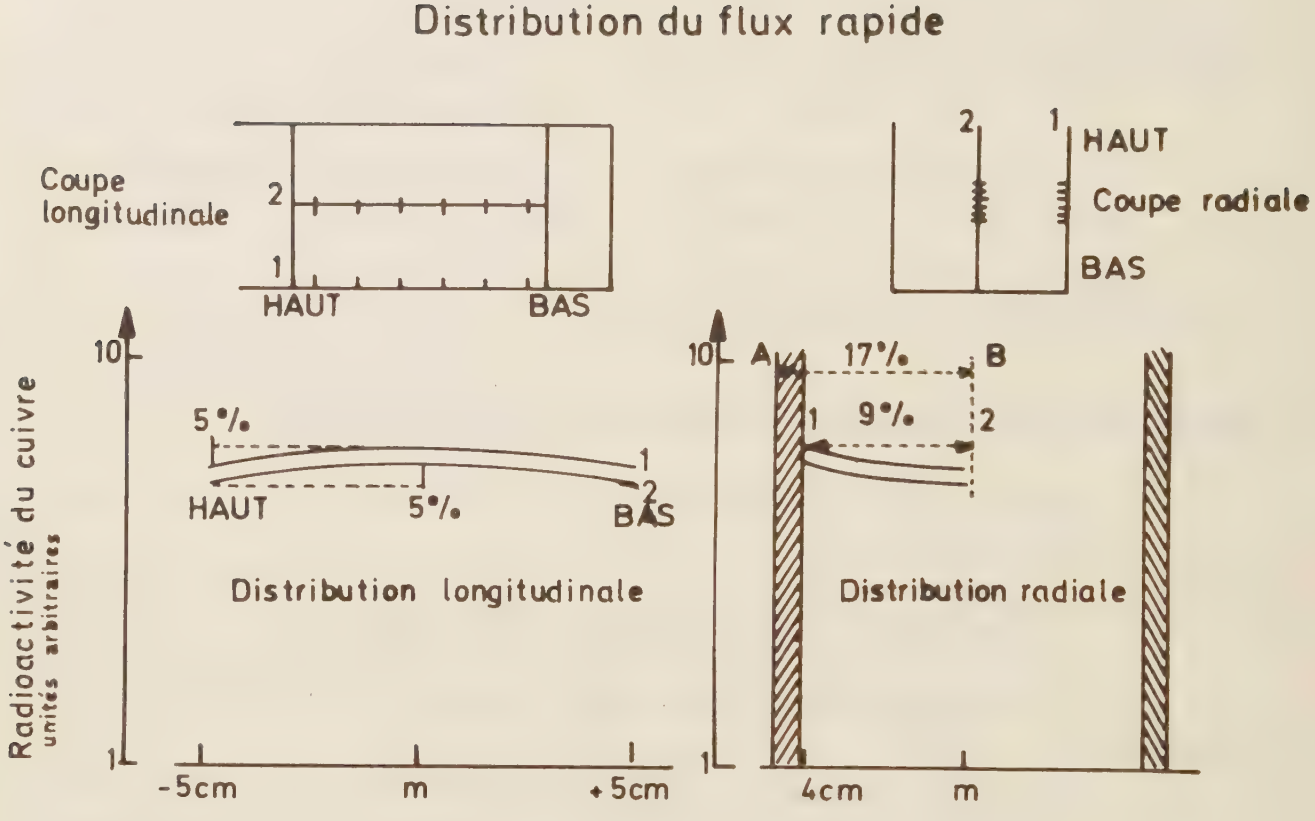


Figure II.4 - Distribution longitudinale et radiale du flux de neutrons rapides à l'intérieur du conteneur.

Les répartitions axiales et longitudinales à l'intérieur du conteneur ont été faites avec neuf détecteurs dysprosium pour chaque série de mesures.

Les résultats obtenus sont groupés sur la figure II.5.

Ainsi, dans le rat, nous obtenons une homogénéité d'irradiation dans l'axe du faisceau à ± 4,5 % pour le flux de neutrons rapides et à ± 9,5 % pour le flux de neutrons thermiques.

Longitudinalement, l'homogénéité obtenue est de

± 2,5 % pour les neutrons rapides

et de ± 5 % pour les neutrons thermiques.

IV - PROTOCOLE EXPERIMENTAL

1. Temps d'irradiation

Nous avons vu qu'il était préférable d'irradier les éléments à déterminer pendant une durée voisine de leurs périodes.

Les isotopes, qui font l'objet de cette étude ont les périodes suivantes :

^{28}Al	2,3 minutes
^{49}Ca	8,9 minutes
^{13}N	10,3 minutes
^{38}Cl	37,7 minutes

Tenant compte de la période relativement courte de ^{28}Al et des impératifs dosimétriques compatibles avec un organisme vivant, le temps d'irradiation choisi est de dix minutes.

La méthode a été mise au point sur deux lots de rats Wistar.

- l'un comprenant quatre femelles et deux mâles âgés de huit à neuf mois et huit femelles et deux mâles âgés de quatorze à quinze mois.

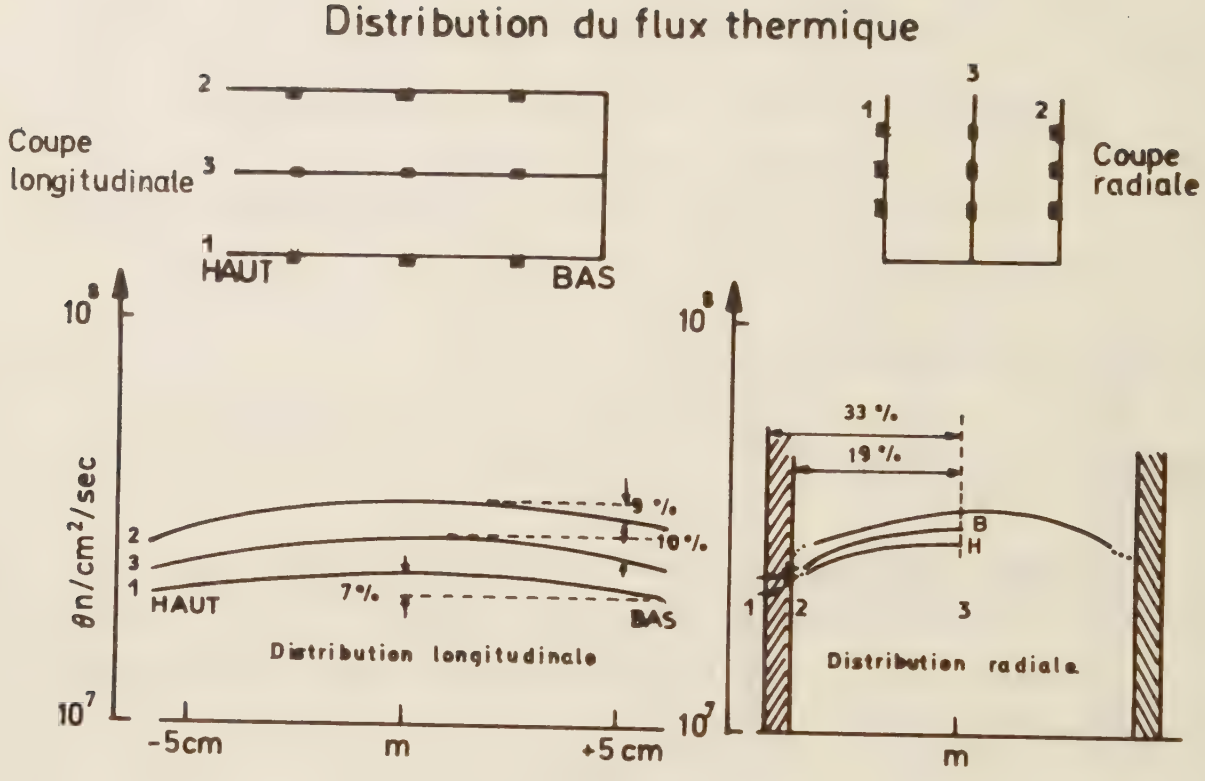


Figure II.5 - Distribution longitudinale et radiale du flux de neutrons thermiques à l'intérieur du conteneur.

- l'autre était composé de cinq femelles âgées de huit mois qui après une irradiation "in vivo" ont été sacrifiées pour vérifier les précédents résultats en analyse destructive.

Les femelles pesaient de 240 à 320 grammes, et les mâles de 350 à 445 grammes.

Treize animaux ont été irradiés vivants après une anesthésie au nembutal à 5 % (0,1 ml pour 100 g de poids). Ils ont ensuite été tués entre vingt huit et trente mois.

Pour chaque irradiation, deux dosimètres de cuivre sont placés dans l'axe du faisceau de neutrons, à l'extérieur du conteneur, afin de déterminer le flux de neutrons émis par la source et de vérifier le bon fonctionnement du dispositif tournant.

2. Préparation du témoin et du blanc

Pour permettre un transfert rapide du site d'irradiation au lieu de comptage, tout en conservant une géométrie aussi proche que possible de celle du rat, un étalon solide a été préparé.

La composition moyenne est la suivante :

O	70 %
C	14 %
H	10 %
Ca	1 %
N	3 %
P	1 %
K	0,2 %
Cl	0,1 %
Na	0,1 %

Ainsi pour un rat de 100 g les différents constituants entrant dans la composition de l'étalon sont donnés dans le tableau II.2 .

La teneur élevée de la gélatine en azote n'est malheureusement pas toujours constante. Or la composition chimique de l'étalon doit être connue avec la plus grande précision. A des dosages chimiques répétés, il est préférable de soustraire de l'étalon la contribution en azote de la gélatine.

Tableau II.2 - COMPOSITION DE L'ETALON ET DU BLANC

1) Composition d'un étalon équivalent rat de 100 g.

Constituants	Quantités en g
Eau	56
Gélatine	9,3
Glucose	19
$Ca(NO_3)_2$	4
Urée	5
H_3PO_4	4
KOH	0,3
NaCl	0,2

2) Composition du blanc de l'étalon de 100 g

Composition	Quantités en g
Eau	60
Gélatine	9,3
Glucose	22

Pour cela, un échantillon "blanc" a été irradié, dans la même géométrie à la suite de chaque étalon. Il contient sous la forme d'un mélange d'eau, gélatine et glucose des quantités d'hydrogène, d'oxygène et de carbone très proches de celle de l'étalon et la même quantité de gélatine.

Les irradiations aussi bien de l'animal que de l'étalon et du blanc sont pratiquées pendant dix minutes, puis, les échantillons, après avoir été débarrassés de leur enveloppe de plastique, sont placés dans un récipient sur le cristal d'iodure de sodium afin de mesurer la radioactivité induite.

Les temps de comptage adoptés sont les suivants :

- quatre minutes après la fin de l'irradiation deux comptages d'une minute dans la bande d'énergie 1,78 MeV permettant de détecter l'aluminium-28 qui provient de la réaction : $^{31}P(n,\alpha)^{28}Al$.

- Dix minutes après la fin de l'irradiation un comptage de dix huit minutes dans la bande d'énergie 3,1 MeV va permettre de détecter le calcium-49.

- Trente minutes après la fin de l'irradiation cinq comptages de deux minutes dans la bande d'énergie 511 KeV permettent de détecter l'azote-13 et de vérifier sa période.

- Enfin trente-sept minutes de comptages dans la bande d'énergie 2,16 MeV permettront la détection du chlore-38.

V - RESULTATS

Pour illustrer ces résultats, un spectre gamma obtenu chez une rate, après dix minutes d'irradiation, est donné sur la figure II.6.

D'autre part, les premiers résultats de dosages simultanés par activation neutronique sont les suivants :

N	34 $\pm$ 3,4 (σm)	g/kg
P	7,8 $\pm$ 1,2	
Ca	12,8 $\pm$ 1,5	
Cl	1,4	

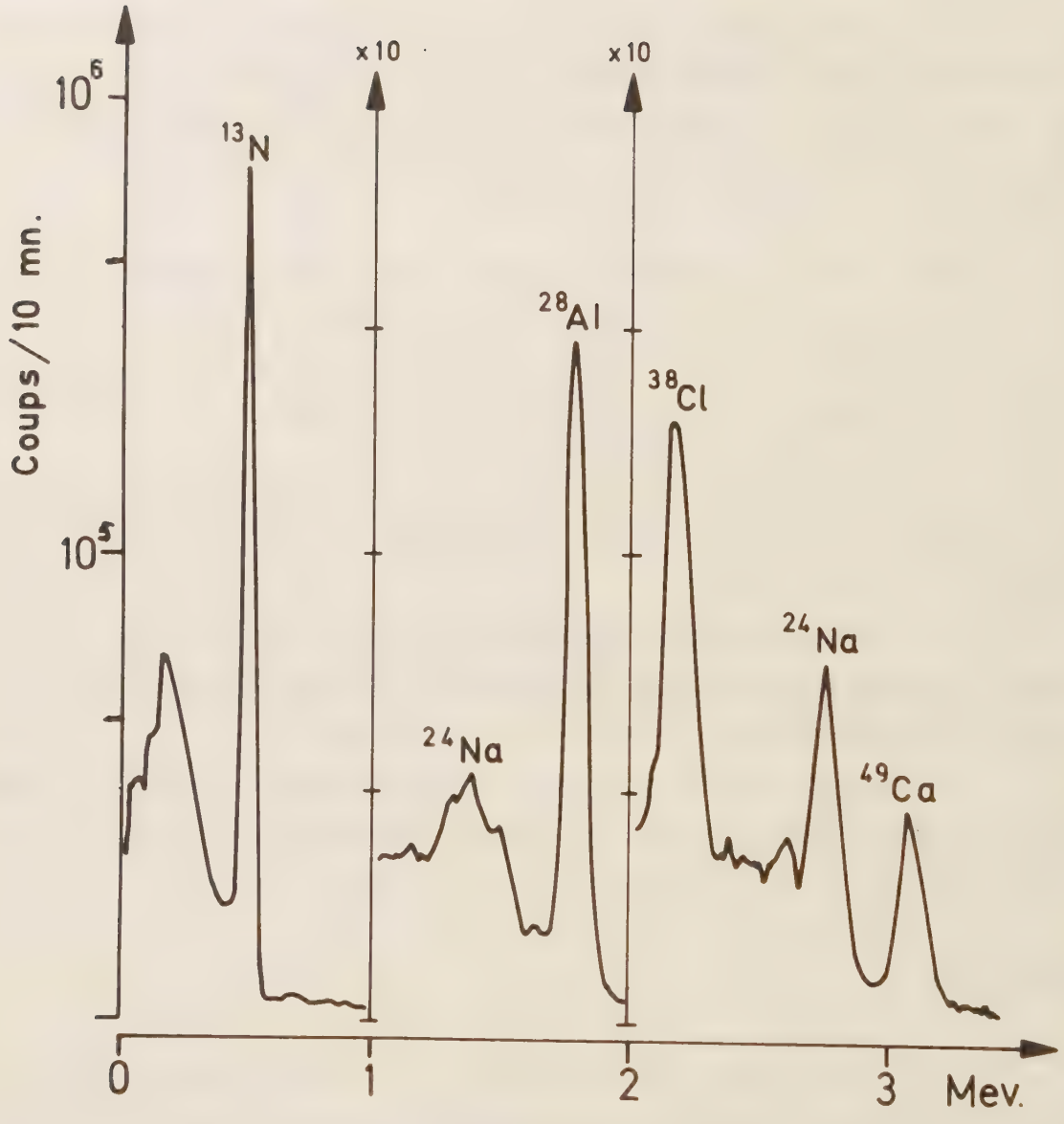


Figure II.6 - Spectre gamma obtenu chez une femelle Wistar après dix minutes d'irradiation.

VI - DISCUSSION

1. Problème posé par les interférences

La figure II.7 représente un spectre obtenu dans nos conditions expérimentales avec, pour chaque pic photoélectrique, la réaction nucléaire qui lui a donné naissance ainsi que les réactions parasites dont nous avons étudié l'ampleur des interférences.

1.1 - Dosage de l'azote

Le seul pic photoélectrique qui permette de doser l'azote correspond à l'annihilation des β^+ émis par l'azote-13 au cours de sa décroissance. Tout radioélément émetteur β^+ peut donc interférer avec l'azote-13.

L'analyse de la radioactivité induite dans la bande d'énergie 511 keV à l'aide de comptages courts en multiéchelle a permis d'estimer à 10,3 minutes la période de décroissance de l'azote-13.

La première interférence envisagée a été la réaction $^{31}P(n,2n)^{30}P$ qui a 2,5 minutes de période. La courbe de décroissance du photopic complexe permet de bien dissocier les activités imputables au phosphore-30 et à l'azote-13. En pratique, il suffit d'attendre vingt minutes avant de commencer les comptages, pour que cette réaction gênante soit éliminée.

Le potassium-38m de 7,7 minutes de période est également émetteur β^+. Il est produit par la réaction : $^{39}K(n,2n)^{38m}K$ qui a 7,7 minutes de période. Dans ce cas, les périodes du potassium-38 m et de l'azote-13 sont malheureusement trop voisines pour être dissociées. Afin de connaître l'incidence de cette interférence sur le dosage de l'azote-13, nous avons irradié successivement :

5 g de potassium dans un fantôme équivalent-rat contenant approximativement 5 g d'azote et un fantôme équivalent-rat contenant la même quantité d'azote.

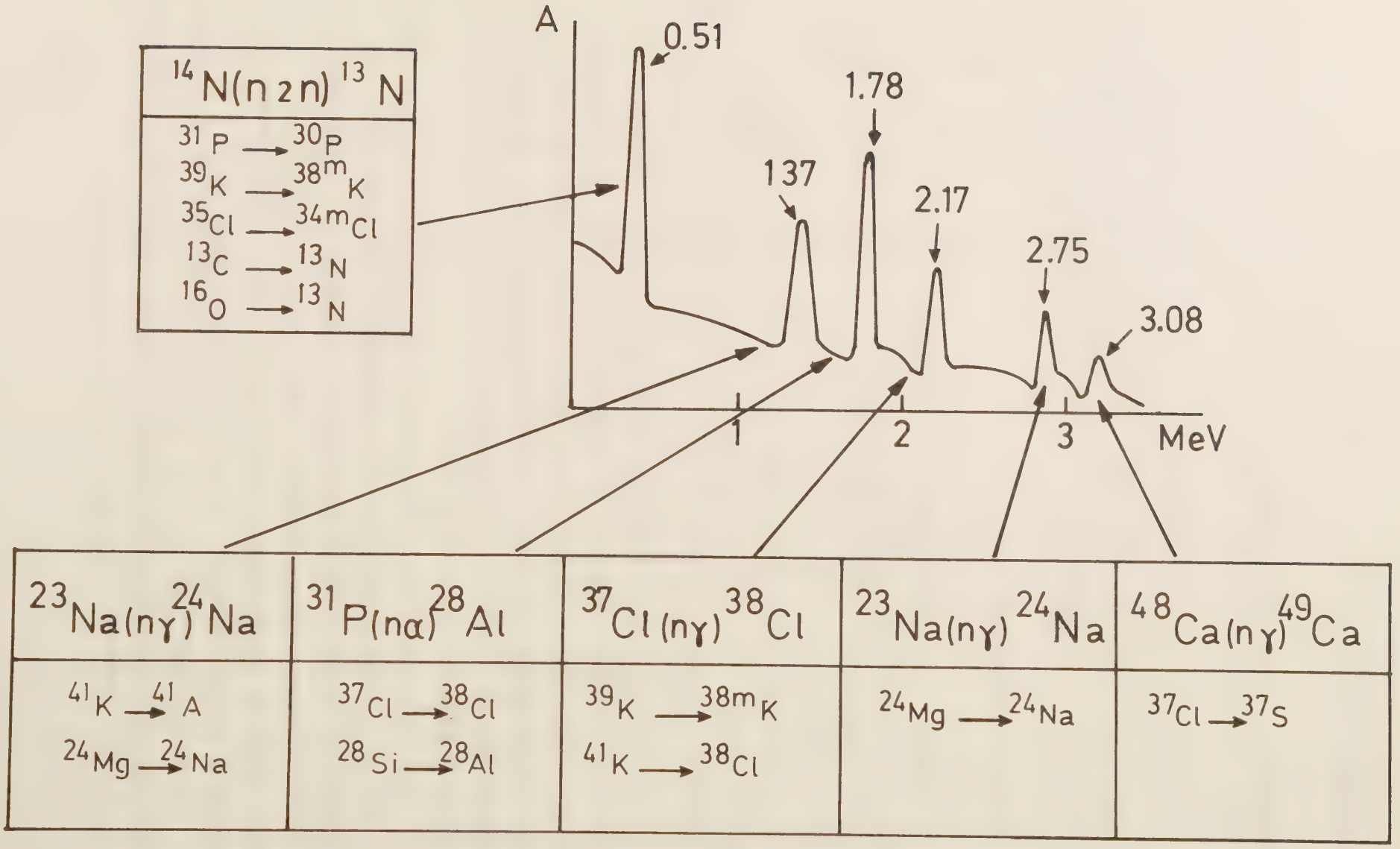


Figure II.7 - Spectre gamma - Etude des interférences.

La présence du potassium élève l'activité induite dans la bande d'énergie 511 keV (mesurée à l'instant de fin d'irradiation) de 13%.Mais, aux concentrations prévues dans le rat (0,25 % de K et 3 % de N environ) l'interférence qui pourrait exister (2 à 3 %) n'a pu être détectée.

Il faut aussi tenir compte de la présence du chlore dans le rat, mais l'interférence du ^{34m}Cl ($^{35}Cl(n,2n)^{34m}Cl$ - 32,4 minutes de période) dans la bande d'énergie 511 keV doit se trouver éliminée par la présence du chlore dans l'étalon en concentration voisine de celle du rat (0,10 %).

Enfin l'étude de GILMORE /51/ a montré qu'en solutions aqueuses ou organiques des réactions secondaires peuvent être induites par les protons de recul émis au cours de l'irradiation. Ces protons de recul sont formés par les collisions de neutrons de haute énergie avec l'hydrogène. Ils ont une énergie suffisante pour réagir sur les atomes d'oxygène ou de carbone et donner lieux aux réactions suivantes :

$$^{13}C(p,n)^{13}N$$

et $$^{16}O(p,\alpha)^{13}N$$

GILMORE a étudié plus spécialement la réaction sur le carbone pour le dosage de l'azote dans les hydrocarbures. Il estime que l'augmentation d'activité, à 511 keV, imputables à ces interférences est de 0,2 %.

Cependant, PALMER /83/ mentionne des études faites sur des tissus de boeuf. Elles permettent d'estimer à moins de 10 % de l'azote total la quantité de "faux azote" produit dans le corps par l'oxygène. Ces réactions parasites sont éliminées dans l'étalon par la soustraction d'un blanc contenant des masses de carbone, d'hydrogène et d'oxygène identiques à celles de l'étalon. Mais elles demeurent dans le rat.

Or, chez les mammifères, il y a :

O	65 %
H	11 %
C	18 %

soit 93 % du poids du corps. En ne considérant que ces éléments dans un volume donné, les pourcentages sont les suivants :

O	69,9 %
H	10,75 %
C	19,35 %

Pour étudier ces réactions parasites dans le rat, nous avons utilisé un mélange d'éthanol (37 %) et d'eau (63 %) dans lequel les pourcentages d'oxygène, d'hydrogène et de carbone sont de :

O	68,9 %
H	11,8 %
C	19,3 %

L'eau bidistillée est conservée à l'abri de l'air dans un récipient en quartz. Le mélange alcool-eau est préparé immédiatement avant l'irradiation puis compté dans une enveloppe non irradiée de forme voisine de celle du rat.

La valeur de l'interférence trouvée est remarquablement constante. Rapportée au poids de l'animal elle est de 0,4 %. Rapportée à l'azote total corporel, l'erreur due à cette double interférence est supérieure à 10 %.

Etudiées séparément les interférences de ces réactions parasites modifient peu la mesure de la radioactivité de l'azote-13. Cependant, cumulées les unes aux autres, elles contribuent à fausser d'une façon significative la radioactivité induite dans cette bande d'énergie.

Il faut donc soustraire à la quantité d'azote trouvée le "faux azote" produit par la matrice biologique. De plus, du potassium en concentration voisine de celle du rat doit entrer dans la composition de l'étalon.

1.2 - Dosage du phosphore

En raison du pouvoir de résolution du détecteur utilisé (10 %), le photopic à 1,64 MeV dû au chlore-38 pourrait fausser le dosage du phosphore. Mais l'activité induite par l'aluminium-28, si le temps de refroidissement n'est pas trop long par rapport à sa

période, est suffisante pour permettre de négliger cette interférence. La période de décroissance trouvée est de 2,3 minutes.

La réaction $^{28}Si(n,p)^{28}Al$ a été jugée négligeable dans la mesure du phosphore. On estime, en effet, que la concentration de cet élément est de 100 p.p.m. chez les mammifères.

1.3 - Dosage du chlore

La mesure de l'activité induite à 2,16 MeV a permis d'estimer la période du chlore à 37,7 minutes.

Théoriquement, le potassium devrait interférer (dans le rat le rapport K/Cl = 2,2). L'activité induite dans la bande d'énergie 2,16 MeV peut être imputable à trois réactions :

$^{39}K(n,2n)^{38m}K$ avec 7,7 minutes de période

$^{41}K(n,\alpha)^{38}Cl$ avec 37,7 minutes de période

et enfin $^{37}Cl(n,\gamma)^{38}Cl$.

En introduisant 5 g de potassium et 2,24 g de chlore dans un fantôme équivalent-rat de 300 g, le rapport :

$$\frac{\text{activité } ^{38m}K + \text{activité } ^{38}Cl \text{ (provenant du potassium)}}{\text{activité } ^{38}Cl \text{ (provenant du Cl)}}$$

est égal à 0,9 . Cependant trente minutes après la fin de l'irradiation, la contribution de potassium 38m est négligeable et l'interférence est inférieure à 5 %. La présence du potassium dans l'étalon permet de l'annuler.

1.4 - Dosage du calcium

Dans la bande d'énergie 3,1 MeV, le chlore peut fausser le dosage du calcium ($^{37}Cl(n,p)^{37}S$ - période = 5 minutes - principale énergie gamma = 3,08 MeV).

Pour le rat, des comptages de dix minutes, commençant deux minutes après la fin de l'irradiation, ont mis en évidence un raccourcissement de la période. Elle est de 7,8 minutes environ au lieu de 8,9 minutes.

Avec 5 g de chlore, dans un blanc de volume proche de celui de l'échantillon à doser, le rapport des activités induites par le soufre-37 à 3,10 MeV et par le chlore-38 à 2,16 MeV a été calculé. A l'instant de fin d'irradiation, il est environ de 11 %. La présence du chlore dans l'étalon et dans l'échantillon, en concentrations voisines, permet de négliger cette interférence.

2. Reproductibilité des résultats et homogénéité spatiale des flux de neutrons

2.1 - Dosage d'un élément contenu dans des volumes différents

Une différence de volume de 150 cm^3 correspond à une différence de taux de comptage de 25 %. Dans nos conditions opératoires un écart de 30 cm^3 entre l'animal et l'étalon entraine une erreur de 5 %. C'est la raison pour laquelle l'étalon a toujours été préparé en fonction du poids des rats à analyser.

2.2 - Correction due à la présence de la gélatine dans l'étalon

Le but essentiel de la gélatine est de faciliter la manipulation de l'étalon. L'analyse chimique de plusieurs prélèvements a montré qu'elle contient en moyenne 15,2 % $\pm$ 0,1 d'azote. Des quantités croissantes d'urée dans un fantôme équivalent-rat ont permis de tracer une droite d'étalonnage pour l'analyse par radioactivation. Nous avons alors estimé à 4,65 g (15,5 %) la quantité d'azote contenue dans 30 g de gélatine mis dans un étalon. Cette valeur élevée contribue à diminuer la précision statistique avec laquelle la mesure de l'azote est obtenue lorsque la soustraction d'un "blanc" à un étalon doit être faite.

2.3 - Limites de dosage

La limite de dosage a été définie comme étant la quantité minimum mesurable pour une matrice déterminée et dans des conditions opératoires bien précises (rats pesant 250 à 300 g - détecteurs : NaI(Tl) 7,5 x 7,5 cm et 12,5 x 12,5 cm). Elle est calculée pour une probabilité de 95 % ($2\sqrt{N}$) et une précision relative de 10 % .

Dans ces conditions le seuil minimum mesurable (SMM) a été donné par la formule :

$$SMM = \frac{100^2 . p^2}{2\ E^2} \left(1 + \sqrt{1 + \frac{8\ F\ E^2}{100^2 . p^2}}\right) \qquad /8/$$

avec p = nombre d'écart-type (ici p = 2),
E = précision relative en %,
F = nombre d'impulsions du bruit de fond pendant le temps t .

Pour chaque valeur de F , la mesure des sensibilités expérimentales déterminées pour une matrice donnée permet de déduire la quantité minimum mesurable.

La limite absolue du dosage correspond au seuil minimum détectable au-delà duquel les résultats obtenus ne sont plus significatifs. Il est égal au SMM pour une probabilité de 95 % et une précision relative de 50 %. Les valeurs que nous avons calculées sont présentées sur le tableau II.3. Ce tableau montre que toute modification du volume de la matrice entraîne une modification des limites de dosage. Pour une matrice de volume plus faible, la perte des taux de comptage par autoabsorption étant moins importante, la limite de dosage sera moins élevée. Ainsi, pour un étalon équivalent rat de 100 g,la limite de dosage du calcium est de 0,68 g.

2.4 - Reproductibilité des dosages

Le tableau II.4 concerne les résultats obtenus à la suite de trois irradiations répétées sur le même animal.

La précision calculée expérimentalement sur trois dosages est donc :
pour des rats de poids supérieur à 100 g

de ± 0,5 % pour l'azote
de ± 2 % pour le phosphore
de ± 2-3 % pour le calcium
et de ± 6 % pour le chlore.

Cette dernière valeur s'explique aisément par la faible teneur (0,1 %) en chlore de l'organisme du rat.

Tableau II.3 - LIMITES DE DOSAGE

I - Détecteur : NaI(Tl) 12,5 x 12,5 cm - Matrice : rat de 250 g.

Elément	Limite de dosage exprimée en g*	Limite absolue exprimée en g**
N	0,9	0,17
P	0,3	0,05
Ca	2	0,4
Cl	0,2	0,04

II - Détecteur : NaI(Tl) 12,5 x 12,5 cm - Matrice : rat de 100 g.

Elément	Limite de dosage exprimée en g*	Limite absolue exprimée en g**
N	0,35	0,07
P	0,25	0,05
Ca	0,68	0,18
Cl	0,15	0,03

* probabilité 95 % - précision 10 %.

** probabilité 95 % - précision 50 %.

Tableau II.4 - REPRODUCTIBILITE

Dosages répétés de l'azote, du phosphore, du chlore et du calcium par radioactivation neutronique d'un même rat.

Animaux		Eléments							
		Azote				Phosphore			
Sexe	Poids en g	Résultats en g	M	σ	Précision en %	Résultats	M	σ	Précision en %
♀	93	2,78-2,73-2,80	2,77	0,04	1,5	0,49-0,5-0,45	0,48	0,03	6
	159	4,3-4,38-4,35	4,34	0,03	0,6	0,87-0,85-0,84	0,85	0,02	2
	290	10,33-10,35-10,32	10,33	0,02	0,2	2,27-2,19-2,30	2,25	0,06	2
	313	10,38-10,35-10,44	10,39	0,05	0,5	2,15-2,13-2,22	2,17	0,05	2
	320	10,39-10,36-10,48	10,41	0,07	0,7	2,48-2,58-2,5	2,52	0,06	2
♂	500	10,6-16,5-16,45	16,52	0,09	0,5	3,03-3,04-3	3,02	0,02	0,8
	533	16,84-16,68-16,79	16,77	0,09	0,5	2,7-2,73-2,77	2,73	0,04	1,5

		Chlore				Calcium			
Sexe	Poids en g	Résultats en g	M	σ	Précision en %	Résultats	M	σ	Précision en %
♀	93	0,12-0,16-0,15	0,14	0,02	14	0,54-0,59-0,68	0,60	0,08	13
	159	0,18-0,17-0,15	0,17	0,02	10	1,24-1,28-1,20	1,21	0,03	3
	290	0,29-0,27-0,28	0,28	0,01	4	3,39-3,43-3,38	3,4	0,03	0,9
	313	0,27-0,28-0,3	0,28	0,02	6	3,23-3,31-3,15	3,23	0,09	3
	320	0,33-0,35-0,37	0,35	0,02	6,5	3,48-3,53-3,58	3,53	0,06	2
♂	500	0,43-0,47-0,42	0,44	0,02	5	4,16-4,12-4,27	4,18	0,09	2
	533	0,53-0,55-0,52	0,53	0,02	3,3	4,5-4,40-4,45	4,46	0,08	2

M = moyenne σ = écart type

pour un petit nombre de mesures σ ≈ Etendue x Kn /3/

2.5 - Hétérogénéité des échantillons

Nous avons négligé l'azote et le chlore dont la répartition dans l'organisme est beaucoup plus homogène.

Le calcium et le phosphore étant dosés, cinq rats ont été soigneusement hachés puis réirradiés. Nous avons supposé que la perte de poids causée par cette opération concerne en priorité l'eau et la graisse et que, par conséquent, les quantités de calcium et de phosphore à doser dans les deux cas étaient voisines. La différence entre les quantités trouvées des deux éléments concerne plus la précision du dosage que le changement de géométrie. (Tableau II.5).

3. Comparaison des résultats obtenus en analyse par radioactivation neutronique avec l'analyse destructive

La méthode mise au point, il convenait de justifier l'exactitude des résultats obtenus "in vivo".

Il faut en effet vérifier que :

- ni la répartition hétérogène des éléments dans l'échantillon,
- ni les interférences, bien que corrigées par la composition de l'étalon,

ne faussent les dosages.

Pour cela, après l'analyse par radioactivation, des analyses destructives ont été pratiquées sur un lot de femelles Wistar âgées de huit mois.

3.1 - Mise en solution du rat

La méthode que nous utilisons est la suivante : les animaux sont sacrifiés par rupture des vertèbres cervicales. La peau est rapidement prélevée et pesée séparément. Le corps du rat est broyé au mixer avec les deux tiers de son poids en eau. A vitesses croissantes, cinq minutes suffisent. Cette technique permet d'obtenir une bonne homogénéisation même pour le squelette. De plus, l'eau utilisée est déminéralisée puis bidistillée et conservée dans un récipient en quartz. Il y a donc peu de contamination.

Tableau II.5 - RESULTATS COMPARES DE DOSAGES SIMULTANES DU PHOSPHORE ET DU CALCIUM EN ANALYSE PAR ACTIVATION APRES MODIFICATION DE LA GEOMETRIE DU MILIEU.

Poids du rat (g)		Phosphore (g)				Calcium (g)			
in vivo	in vitro	in vivo	in vitro	M	E.max	in vivo	in vitro	M	E.max
304	291	2,21	2,29	2,25	0,04	3,5	3,2	3,35	0,3
324	304	2,38	2,41	2,39	0,01	3,75	4	3,87	0,12
277	265	2,38	2,64	2,46	0,18	3,5	3,6	3,55	0,05
433	411	2,84	2,79	2,81	0,02	4,73	5	4,86	0,13
415	391	2,77	2,88	2,82	0,05	4,68	4,26	4,47	0,21

3.2 - Méthodes destructives utilisées

Dosage de l'azote total par microméthode (appareil PARNAS et WAGNER - type F. MARTIN) :

La substance à analyser est attaquée par de l'acide sulfurique fumant en présence d'un catalyseur dont les propriétés réductrices ont pour but d'accélérer la décoloration.

L'azote est ainsi transformé quantitativement en sulfate d'ammonium. La minéralisation terminée, l'ammoniac est libéré par la soude puis distillé en présence de vapeur d'eau. Le distillat est recueilli dans une solution d'acide borique dont le rôle est d'absorber l'ammoniaque au cours de sa formation, en présence d'un indicateur coloré, le vert de bromocrésol. On procède ensuite à un titrage direct comme si on avait affaire à une solution pure d'ammoniaque par une solution titrée d'acide chlorhydrique.

Dosage du chlore (méthode de VAN SLYKE modifiée par CARIUS)

Les échantillons à doser sont placés durant seize à vingt heures à 4° en présence de nitrate d'argent 0,075 N. On ajoute alors de l'acide nitrique concentré. La minéralisation se fait dans un bain marie porté à 96-97° pendant six heures. On titre dans un bain de glace avec NH_4 CNS 0,02 N.

Dosage du phosphore (analyse par radioactivation. Neutrons incidents : 14 MeV).

Dans la mesure où aucune interférence n'est susceptible de gêner la détection du phosphore dans l'organisme du rat, l'analyse par radioactivation des prélèvements peut se justifier.

Le dispositif d'irradiation situé près de la cible du générateur de neutrons a été utilisé. Mis au point à Grenoble par le groupe de M. LAVERLOCHERE, il permet d'irradier simultanément un échantillon et son étalon en rotation rapide.

L'échantillon à analyser contenait approximativement 1,3 g d'homogénat de rat.

L'étalon utilisé comprend 0,98 g de triphénylphosphine dont la teneur en phosphore est de 11,81 % .

Le mode opératoire adopté est le suivant :

- temps d'irradiation 270 secondes,
- temps de transfert 60 secondes,
- la méthode de comptage choisie est le comptage en multiéchelle. Les canaux du sélecteur sont alors utilisés successivement pour stocker les impulsions contenues dans une bande d'énergie soigneusement délimitée et pour tracer directement la courbe de décroissance. Le temps de comptage est de 12 secondes par canal. Echantillon et témoin sont alternativement comptés pendant cinq minutes (25 canaux).
- Dosage du calcium (analyse par activation).

Dans la mesure où l'interférence du soufre-37 peut être éliminée, l'analyse par activation du calcium est une méthode valable et rapide.

Pour cela, deux cruchons de polyéthylène sont placés au centre d'une cartouche. L'un contient environ trois grammes d'homogénat de rat, l'autre une solution étalon dont la composition chimique est la suivante :

Calcium	10 mg
Sodium	0,5 mg
Chlore	0,5 mg

La cartouche est irradiée deux minutes dans les canaux pneumatiques du réacteur Mélusine, les flux d'activation sont respectivement :

de $7{,}75.10^{12}$ $n.cm^{-2}s^{-1}$ pour le flux thermique

et de 9.10^{10} $n.cm^{-2}s^{-1}$ pour le flux rapide.

Le rapport de ces flux permet de tenir l'interférence du soufre-37 dans la bande d'énergie 3,10 MeV pour négligeable. De plus le chlore sert d'étalon interne. Echantillon et étalon sont mesurés en spectrométrie gamma. Des comptages de cinq minutes ont permis de détecter et de mesurer le calcium-49 et le chlore-38 dans l'échantillon et le témoin.

3.3 - Résultats

La comparaison entre ces différents résultats obtenus en analyses "in vivo" et destructive est faite dans les tableaux II.6, II.7, II.8, et II.9.

Ils appellent quelques commentaires :

- les dosages "in vitro" de l'azote total chez le rat ont permis de déterminer les teneurs en azote de la peau (5 %) des poils (13,65 %) et du corps lui-même (2,55 %).

De la même façon les concentrations en chlore de la peau et du corps du rat sont respectivement de 0,24 % et de 0,08 %. En analyse par radioactivation à Mélusine, la teneur en chlore du corps de l'animal a été estimée à 0,085 %.

- les teneurs en calcium et phosphore de la peau et des poils du rat étant théoriquement très faibles, les dosages de ces deux éléments n'ont été faits que sur l'homogénat du corps de l'animal.

- Toutes les valeurs trouvées en analyse destructive sont plus faibles que celles trouvées par l'analyse du vivant. Ces écarts sont respectivement de :

3 % pour l'azote et le chlore
de 3,5 % pour le calcium
et de 7 % pour le phosphore (Tableau II.10).

Il est possible que l'absence de valeur pour la concentration cutanée en phosphore soit partiellement responsable de cette dispersion des résultats.

Pour l'ensemble des dosages en analyse destructive, quelles que soient les précautions, des pertes occasionnées par l'homogénisation de corps de l'animal peuvent se produire.

Enfin les résultats obtenus dans cette étude peuvent être comparés à ceux donnés en 1960 par WIDDOWSON et McCANCE /107/. Ces auteurs expriment leurs résultats obtenus, par des analyses chimiques en g/kg de rat libre de graisse. Pour que la comparaison soit valable, nous avons jugé préférable de les exprimer en rapports de concentrations (Tableau II.11).

Tableau II.6 - DOSAGE DU PHOSPHORE TOTAL*.

Résultats obtenus par radioactivation neutronique in vivo et par analyse destructive.

Poids des animaux en g	Masses de phosphore en g	
	Activation in vivo	Analyse destructive
246,5	1,70	1,52
292,5	2,02	1,92
295	1,89	1,86
295	1,70	1,5
296	2,04	1,9
Moyennes 285	1,87	1,74
Ecarts-types ± 21	± 0,16	± 0,18
Ecarts-types relatifs	9 %	10 %

* Le corps du rat sans la peau a été analysé.

Tableau II.7 - DOSAGE DU CALCIUM TOTAL *.

Résultats obtenus par radioactivation neutronique in vivo et par analyse destructive.

Poids des animaux en g	Masses de calcium en g	
	Activation in vivo	Analyse destructive
246,5	2,8	2,46
292,5	2,99	3,06
295	3,13	2,96
295	2,95	3,12
296	3,11	3,05
Moyennes 285	3	2,9
Ecarts-types ± 21	± 0,14	± 0,3
Ecarts-types relatifs	5 %	10 %

* Le corps du rat sans la peau a été analysé.

Tableau II.8 - DOSAGE DE L'AZOTE TOTAL.

Résultats obtenus par radioactivation neutronique in vivo et par analyse destructive.

Poids des animaux en g	Masses d'azote en g	
	Activation in vivo	Analyse destructive
225,5	7	6,81
246,5	7,73	7,24
295	8,77	8,67
295	8,67	8,79
296,5	9	8,75
Moyennes 272	8,25	8
Ecarts-types ± 30	± 0,8	0,8
Ecarts-types relatifs	10 %	10 %

Concentrations d'azote :

- dans la peau du rat 5 %
- dans les poils du rat 13,6 %
- dans le corps du rat 2,55 %

Tableau II.9 - DOSAGE DU CHLORE TOTAL.

Résultats obtenus par radioactivation neutronique in vivo et par analyse destructive.

Poids des animaux en g	Masses de chlore en g	
	Activation in vivo	Analyse destructive
225,5	0,246	0,230
246	0,267	0,260
246,5	0,281	0,282
292,5	0,295	0,274
295	0,334	0,337
Moyennes 261	0,285	0,277
Ecarts-types ± 30	± 0,04	± 0,04
Ecarts-types relatifs	13 %	16 %

Concentrations de chlore :

- dans la peau du rat 0,24 %
- dans le corps du rat 0,08 %

Tableau II.10 - COMPOSITION MINERALE DU RAT*.

Résultats obtenus par radioactivation neutronique in vivo et par analyses destructives **.

	In vivo g/kg	In vitro g/kg
N	30,3 ± 0,8	29,4 ± 0,3
P	6,5 ± 0,5	6,1 ± 0,6
Cl	1,09 ± 0,06	1,06 ± 0,08
Ca	10,6 ± 0,6	10,2 ± 0,2

* Moyenne obtenue sur 5 femelles Wistar âgées de 8 mois.

** Les analyses destructives du phosphore et du calcium ont été faites uniquement sur le corps du rat sans la peau.

Tableau II.11 - COMPOSITION MINERALE DU RAT.

Comparaison des résultats obtenus dans cette étude avec ceux de WIDDOWSON et McCANCE /107/.

	In vivo	In vitro	Références Méthodes chimiques
Ca/P	1,63	1,67	1,69
N/P	4,66	4,82	4,48
Ca/Cl	9,72	9,62	9,88
P/Cl	5,96	5,75	5,82

L'analyse des rapports Ca/Cl et P/Cl met en lumière une différence pour la teneur en chlore total. Elle est dans cette étude plus faible. Cependant en 1964 COTLOWE et HOGBEN /34/ ont analysé le chlore total dans différentes espèces animales dont le rat. La valeur donnée, pour le chlore total du rat par ces auteurs, est de 1,081 g/kg.

4. Dosimétrie

Pour être connue avec précision la dose totale absorbée à l'organisme au cours d'une irradiation doit être calculée à partir du spectre énergétique des neutrons incidents.

C'est donc à partir du flux de neutrons mesuré sur le porte cible et de sa thermalisation à l'intérieur du volume délimité par la paraffine que nous avons calculé la dose absorbée à quinze centimètres de profondeur et pour dix minutes d'irradiation.

Les facteurs de conversion en rads utilisés sont ceux donnés par JONES /64/ pour un fantôme équivalent tissu de 30 x 60 cm (densité 1).

A quinze centimètres de profondeur il sont respectivement de :

- $3{,}5.10^{-9}$ rad $n^{-1}.cm^{-2}$ pour les neutrons rapides,
- et de 5.10^{-11} rad $n^{-1}.cm^{-2}$ pour les neutrons thermiques.

Durant la mise au point de la méthode, les rats Wistar utilisés ont absorbé une dose de l'ordre de 35 rads, ce qui représente environ $1/15^{e}$ de la dose léthale.

VII - CONCLUSION

Le spectre gamma présenté sur la figure II.7 montre en plus des pics d'absorption totale des éléments analysés des raies à 1,64 MeV et 2,75 MeV caractéristiques du sodium-24. Il pourrait donc être tentant de doser cet élément. Plusieurs groupes l'ont déjà fait sur l'homme.

Cependant des interférences importantes peuvent fausser une telle mesure.

En effet l'argon-41 de 110 minutes de période provenant de la réaction $^{41}K(n,p)^{41}A$ émet une raie gamma à 1,29 MeV difficile à séparer de celle à 1,36 MeV du sodium-24. D'autre part, le sodium-24 produit au cours de l'irradiation provient de deux réactions nucléaires :

$$^{23}Na(n,\gamma)^{24}Na \quad \text{et} \quad ^{24}Mg(n,p)^{24}Na \ .$$

La contribution de cette interférence à la radioactivité induite dans la bande d'énergie 2,75 MeV avec des neutrons incidents de 14 MeV est, rappelons-le :

nulle pour COHN et DOMBROWSKI
de 3,4 % pour BATTYE
et de 44 % pour PALMER.

Doser le magnésium, dans nos conditions opératoires de détection, s'est avéré impraticable. L'interférence a donc été mesurée expérimentalement.

Si, dans le rat adulte, le rapport des concentrations Na/Mg est de 3,4, valeurs citées dans différentes études, le sodium-24 provenant de l'activation en neutrons rapides du magnésium élève l'activité induite à 2,75 MeV de 7 %.

En fait la méthode décrite a été étudiée principalement pour le dosage simultané de quatre éléments à savoir :

- l'azote, le phosphore, le chlore et le calcium, avec des neutrons incidents de 14 MeV partiellement ralentis.

Dans le cas du calcium, la sensibilité du dosage, chez le rat adulte, est satisfaisante mais insuffisante pour des animaux de poids inférieur à 100 g. En effet des mesures nous ont montré que pour des animaux de ce poids la précision du dosage du calcium serait de l'ordre de 10 % pour une probabilité de 95 % .

La dose moyenne absorbée par l'organisme du rat, au cours d'une irradiation de dix minutes, dans les conditions décrites, est de l'ordre de 35 Rads. Quoique relativement élevée, cette dose n'a

provoqué aucune perturbation sur l'organisme des huit premiers animaux adultes utilisés. Ils ont tous été tués entre 28 et 30 mois. A l'autopsie, aucune anomalie n'a été détectée.

Cette méthode a donc été utilisée d'une façon systématique pour étudier le métabolisme de l'azote, du phosphore, du chlore et du calcium, en fonction de l'âge, sur une souche de rats OFA.

C H A P I T R E III

ETUDE IN VIVO DE LA COMPOSITION EN AZOTE, CHLORE, PHOSPHORE ET CALCIUM DU RAT OFA EN FONCTION DE L'AGE ET DU SEXE.

I - PROTOCOLE EXPERIMENTAL

1. La souche

Les animaux utilisés au cours de cette étude ont été fournis par le centre de recherche et d'élevage des Oncins. D'origine américaine (SPRAGUE-DAWLEY), la souche OFA a été acclimatée et élevée, en milieu stérile, à St-Germain sur l'Arbresle. Bons reproducteurs, ces animaux ont, en moyenne, un poids un peu supérieur à ceux des rats Wistar plus couramment employés.

2. Les conditions d'élevage

Soumis à un éclairage naturel, les rats ont été élevés dans une animalerie maintenue à une température constante de 23°C. Sexes séparés, ils sont placés, par groupes de quatre ou cinq, dans des cages sur une litière de sciure de bois dépoussiérée. Les animaux ont été pesés et mesurés tous les huit jours en période de croissance, deux fois par mois après le 150ème jour.

3. La diète

Nourriture et eau de boisson sont données ad libitum. Quel que soit leur âge, les rats ont été soumis au même régime synthétique. La composition des biscuits est donnée par la fiche technique U.A.R. n° 103 (Tableau III.1).

FORMULE

Céréales et Produits hydrocarbonés ..	70,60 %
Issues et Légumineuses	0 %
Tourteaux Expellers	10,50 %
Farine d'origine Animale	9,90 %
Activateurs de croissance	5 %
Composé Minéral Vitaminisé ..... (A.D. groupe B).	4 %

ANALYSE MOYENNE

Energie productive (en cal/kg)	1 950
Matières sèches	88
Protéines digestibles	18
Humidité	12
Matières Minérales	6
Matières Cellulosiques	3
Matières azotées totales	20
Matières grasses	4
Extr. non azoté (sucre,amid.).	55
	100

TENEURS EN ACIDES AMINES (calculées)

Arginine	11.200 mg/kg
Cystine	2.900 mg/kg
Lysine	10.300 mg/kg
Méthionine	3.600 mg/kg
Tryptophane	2.600 mg/kg
Glycine	9.600 mg/kg

TENEURS EN MINERAUX

	App. Nat.(moy.)	App. par C.M.	TOTAUX mg/kg
Phosphore ...	6.800	2.400	9.200
Calcium	4.500	4.700	9.200
Potassium ...	6.900	0	6.900
Sodium	1.400	1.600	3.000
Magnésium ...	1.400	130	1.530
Manganèse ...	25	40	65
Fer	100	150	250
Cuivre	13	15	28
Zinc	23	45	68
Cobalt	0,04	1,5	1,54
Iode	apporté sous forme assimilable par algues marines.		

VITAMINES (calculées aux cent kg)

	App. Nat.	App. Synthét.	TOTAUX
Vitamine A_3 ..	95.000 UI	1.500.000 UI	1.595.000 UI
" D^3 ..	2.700 "	400.000 "	402.700 UI
" B1 ..	600 mg	200 mg	800 mg
" B^2 ..	300 "	900 "	1.200 "
" B^3 ..	1.200 "	1.300 "	2.500 "
" B^6 ..	250 "	150 "	400 "
" B^{12} ..	1,8"	2 "	3,8"
" E ..	1.600 "	3.000 "	4.600 "
" K3 ..	15 "	450 "	465 "
" PP ..	5.500 "	3.000 "	8.500 "
Acide Folique.	60 "	0 "	60 "
Biotine	7 "	0 "	7 "
Choline	125.000 "	80.000 "	205.000 "

Tableau III.1 - LA DIETE

4. Description des lots

Sept lots de rats, comprenant chacun dix mâles et dix femelles, sont arrivés du centre d'élevage trois semaines avant l'irradiation. La moitié d'entre eux, élevés dans des conditions identiques, ont servi de témoins.

Nous avons systématiquement écarté tous les animaux de poids trop faibles ou trop élevés et choisi, pour l'expérimentation, ceux dont le poids était proche du poids moyen calculé pour l'ensemble du lot.

Cependant, trois lots de rats font exception à cette règle.

- les animaux les plus jeunes ne nous ont pas été fournis par le centre d'élevage. Ils appartiennent à deux portées issues de témoins qui se sont reproduits à l'animalerie.

Le premier lot comprend quatre femelles et cinq mâles irradiés respectivement au 34ème et au 35ème jour. Ils font partie d'une portée de quinze petits (7 ♀ et 8 ♂).

Le second lot appartient à une portée de treize petits (4 ♀ et 9 ♂), les femelles ont été irradiées au 39ème jour, et quatre des mâles au 40ème jour.

- l'âge des animaux fournis par le centre des Oncins ne pouvant excéder un an, nous avons conservé cent jours au lieu de vingt et un les rats les plus âgés avant de les irradier.

L'âge, le nombre et le poids moyen des rats OFA, utilisés au cours de cette étude, sont donnés dans le tableau III.2.

Cependant, les résultats obtenus avec des lots d'animaux d'âges variés ne représentent pas nécessairement l'évolution de la composition corporelle du rat au cours du temps. Nous avons donc complété cette première étude en irradiant successivement trois fois à des intervalles de temps variés, deux lots de rats. Ainsi l'évolution de la concentration des éléments étudiés en fonction de l'âge chez un même animal permet :

Tableau III.2 - COMPOSITION DES LOTS

- Femelles -						
	Ensemble du lot				Animaux irradiés	
	Age en jours	Nombre	Poids en g M ± σ		Nombre	Poids en g M ± σ
Lot 1	34	7	93	3	4	93 2
Lot 2	39	10	113	4	4	113 3
Lot 3	53	10	158	5	5	156 4
Lot 4	64	10	200	10	5	198 10
Lot 5	78	7	216	15	3	217 12
Lot 6	118	10	250	10	6	249 9
Lot 7	152	10	278	20	6	277 15
Lot 8	222	9	300	10	4	300 8
Lot 9	435	5	315	10	5	314 9
- Mâles -						
	Ensemble du lot				Animaux irradiés	
	Age en jours	Nombre	Poids en g M ± σ		Nombre	Poids en g M ± σ
Lot 1	35	9	109	4	5	108 3
Lot 2	40	9	143	3	4	143 2
Lot 3	55	10	205	8	5	207 6
Lot 4	67	10	277	10	4	277 8
Lot 5	79	9	323	5	3	322 4
Lot 6	118	10	412	10	6	411 7
Lot 7	153	10	432	20	5	432 18
Lot 8	228	9	466	15	4	463 7
Lot 9	437	10	530	15	5	534 10

M : moyenne σ : écart-type à la moyenne

- de discuter les résultats obtenus à la suite d'une seule irradiation,

- d'étudier l'influence de la gestation et de la lactation sur la composition de l'organisme maternel,

- et enfin de mettre en évidence les effets biologiques imputables aux doses absorbées pendant l'irradiation. La radioinduction de la tumeur mammaire a été choisie comme exemple. En effet, les rats d'origine Sprague-Dawley développent spontanément et à une fréquence élevée chez la femelle, non négligeable chez le mâle, des tumeurs de la glande mammaire au cours de leur deuxième et troisième année de vie. Chez les animaux les plus jeunes, le taux d'apparition spontanée de ces tumeurs est nul chez le mâle et inférieur à 2 % chez la femelle. Connaissant cette particularité, on peut donc aisément étudier l'influence d'une ou plusieurs irradiations neutroniques, pratiquées avant l'âge de deux ans, sur la fréquence tumorale.

5. L'anesthésie

Avant l'irradiation, une solution de nembutal à 5 %, injectée par voie intra-péritonéale à raison de 0,07 ml/100 g pour les adultes a permis une anesthésie de deux heures environ. Cette dose a été légèrement diminuée pour les jeunes rats (0,05 ml/100 g).

Ainsi, quarante deux femelles et quarante et un mâles, répartis en neuf lots, ont été irradiés pendant dix minutes. Dans les conditions opératoires fixées, l'analyse "in vivo" de quatre éléments a été pratiquée sur chacun d'entre eux. De plus, dix huit de ces animaux ont subi deux autres irradiations.

II - RESULTATS

1. Etude de la croissance

1.1 - des animaux témoins soumis au régime

Les courbes illustrant la croissance pondérale et staturale des rats OFA soumis à la diète U.A.R n°103 ont été tracées à partir des moyennes $\pm \sigma$ (écart-type à la moyenne) des mesures et

pesées faites sur trente rats jusqu'à 300 jours et sur quinze rats de 300 à 440 jours. La taille et le poids moyens $\pm \sigma$ des neuf lots utilisés pour l'analyse par radioactivation neutronique ont été portés sur chaque courbe (figure III.1a et figures III.2a).

En fait, une analyse détaillée de la croissance des rats témoins permet de mettre en évidence des rythmes variables au cours du développement.

A la naissance le poids moyen des petits, nés de mères recevant la diète précitée, est de 4,5 grammes pour les femelles et de 5,5 grammes pour les mâles. A partir du sevrage, les gains pondéraux journaliers sont les suivants :

	Mâles	Femelles
du 23ème au 34ème jour	5,1 g/jour	3,4 g/jour
34ème au 40ème jour	6,9 g/jour	4,6 g/jour
40ème au 55ème jour	4,3 g/jour	2,7 g/jour
55ème au 65ème jour	5,9 g/jour	4,2 g/jour
65ème au 80ème jour	3,75g/jour	1,4 g/jour
80ème au 120ème jour	2,3 g/jour	0,8 g/jour
120ème au 150ème jour	0,8 g/jour	0,6 g/jour
150ème au 239ème jour	0,4 g/jour	0,3 g/jour
230ème au 440ème jour	0,2 g/jour	0,07g/jour

L'évolution de la prise de poids journalière, plus importante chez le mâle, est comparable pour les deux sexes. Le début de la phase pubertaire (55 à 65 jours) est marqué par une accélération de la croissance. A partir de 230 jours la femelle prend peu de poids. Par contre la croissance reste non négligeable chez le mâle.

Les vitesses d'accroissement du squelette sont les suivantes :

	Mâles	Femelles
du 23ème au 30ème jour	6,4 mm/jour	6,2 mm/jour
30ème au 40ème jour	4 mm/jour	4 mm/jour
40ème au 55ème jour	5,1 mm/jour	3 mm/jour
55ème au 65ème jour	3 mm/jour	2 mm/jour
65ème au 80ème jour	1,1 mm/jour	0,7 mm/jour
80ème au 120ème jour	0,7 mm/jour	0,5 mm/jour

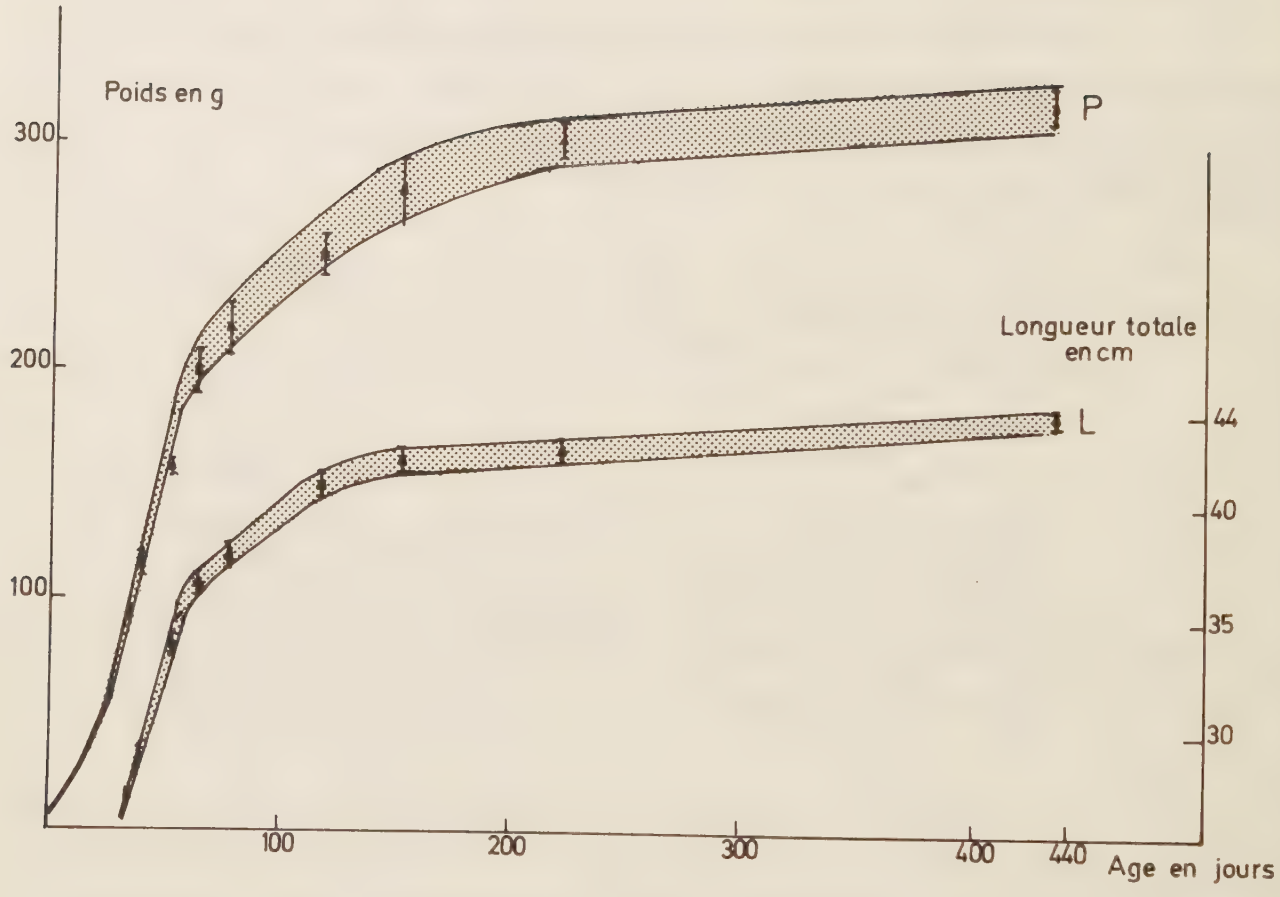


Figure III.1a - Variations du poids et de la longueur totale en fonction de l'âge chez la femelle OFA.

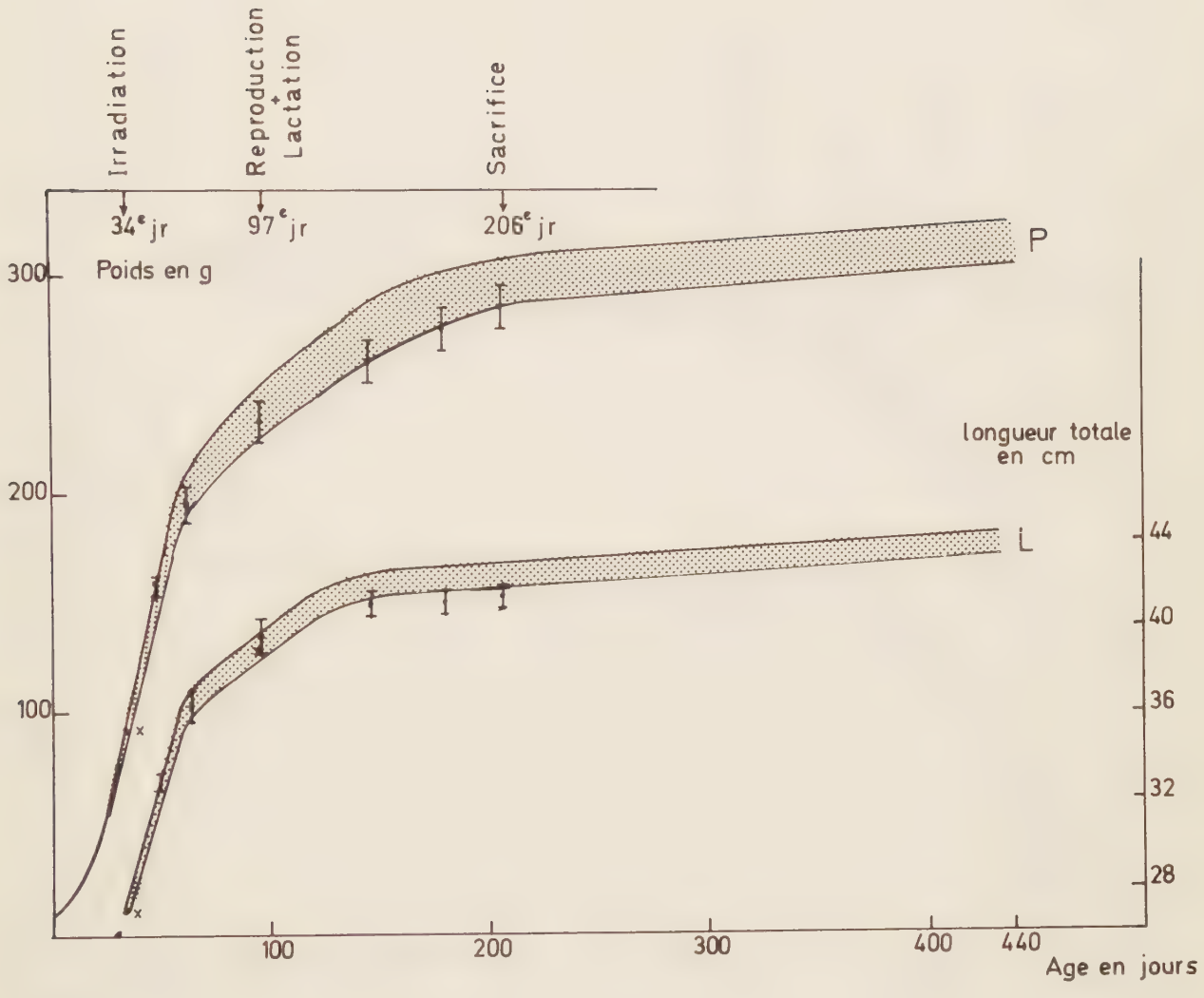


Figure III.1b - Variations du poids et de la longueur totale en fonction de l'âge de quatre femelles OFA irradiées au 34ème jour.

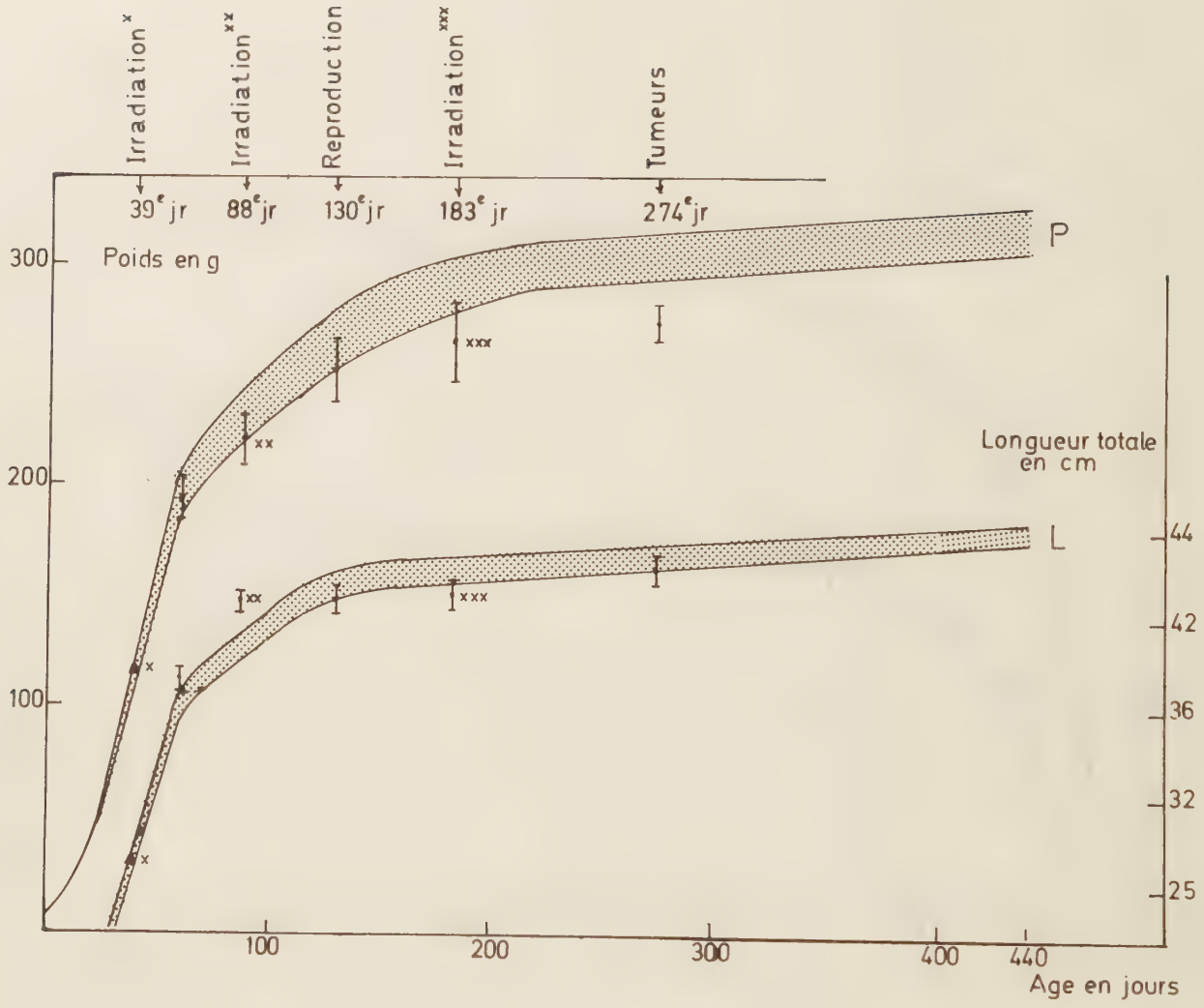


Figure III.1c - Variations du poids et de la longueur totale en fonction de l'âge de quatre femelles OFA irradiées trois fois.

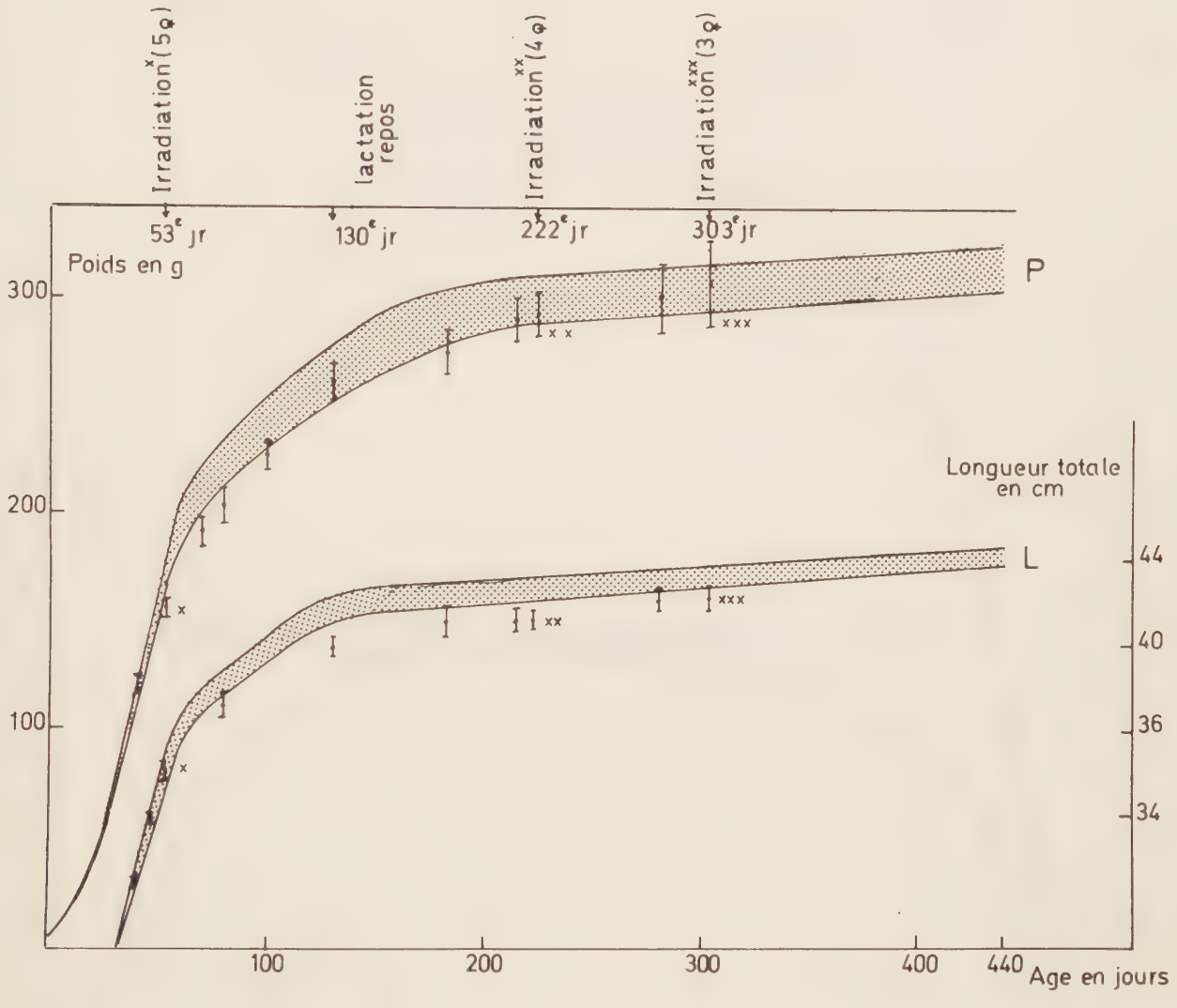


Figure III.1d - Variations du poids et de la longueur totale en fonction de l'âge d'un lot de femelles OFA irradiées trois fois.

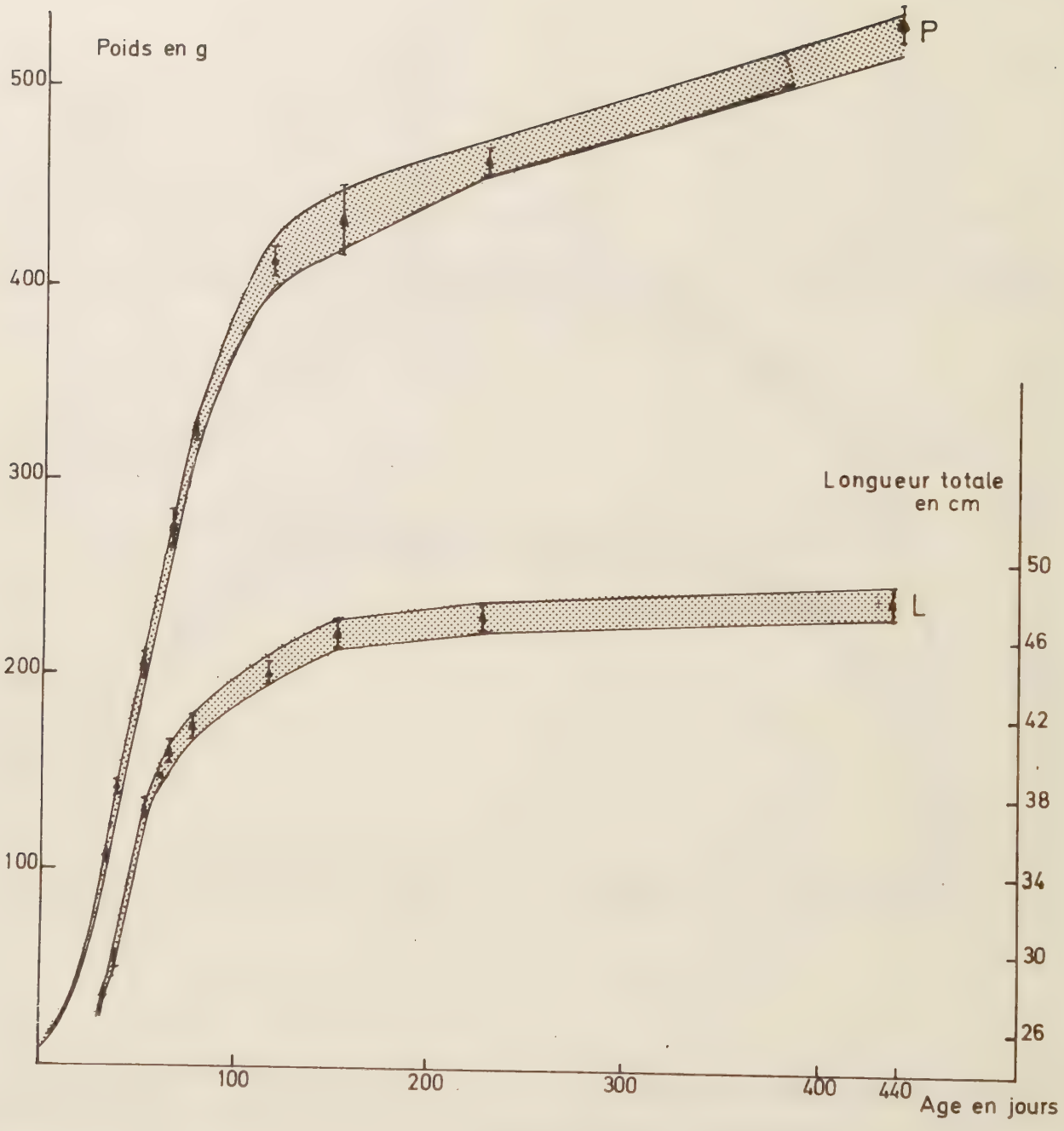


Figure III.2a - Variations du poids et de la longueur totale en fonction de l'âge chez le mâle OFA.

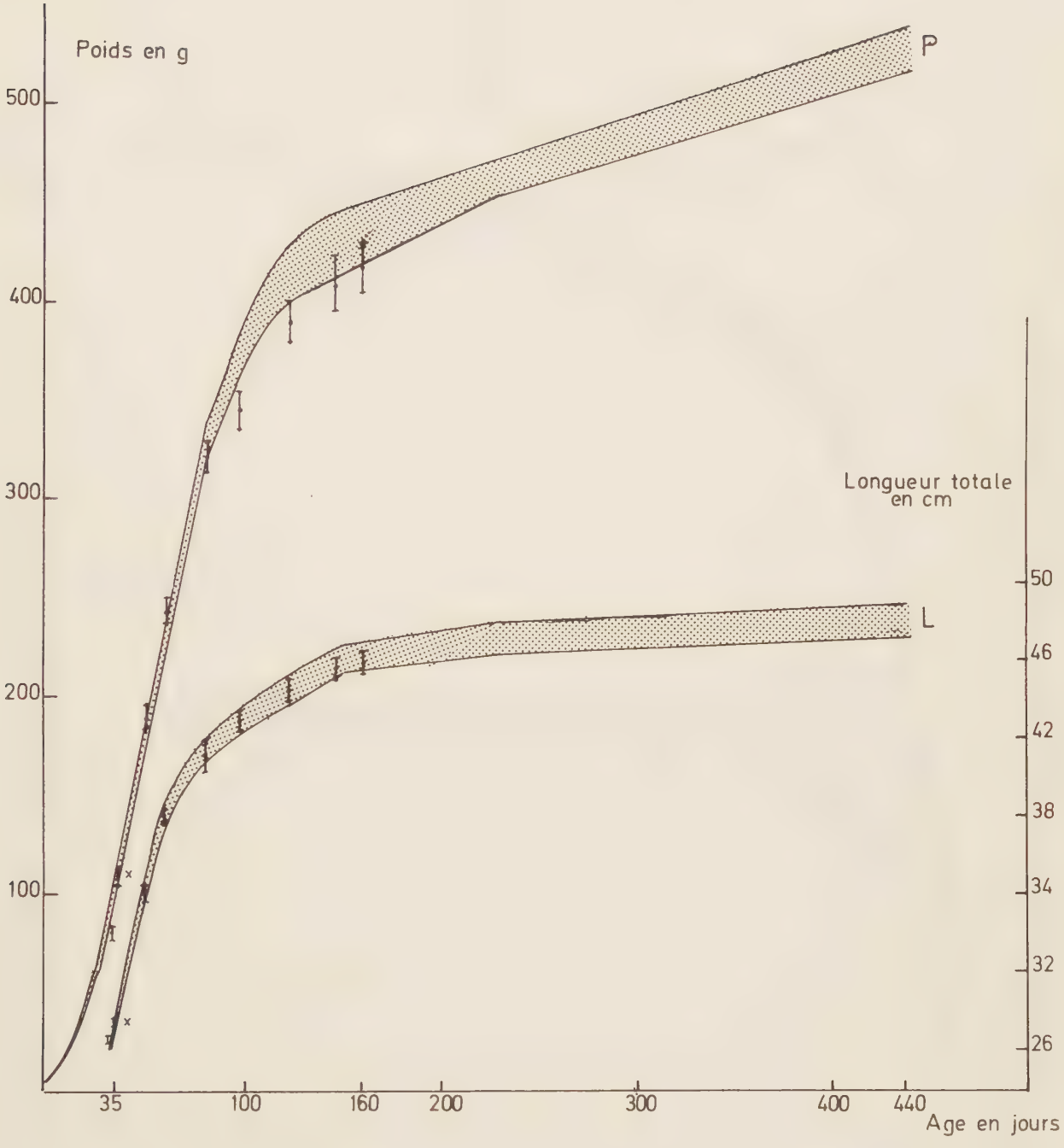


Figure III.2b - Variations du poids et de la longueur totale en fonction de l'âge de cinq mâles OFA irradiés au 35ème jour.

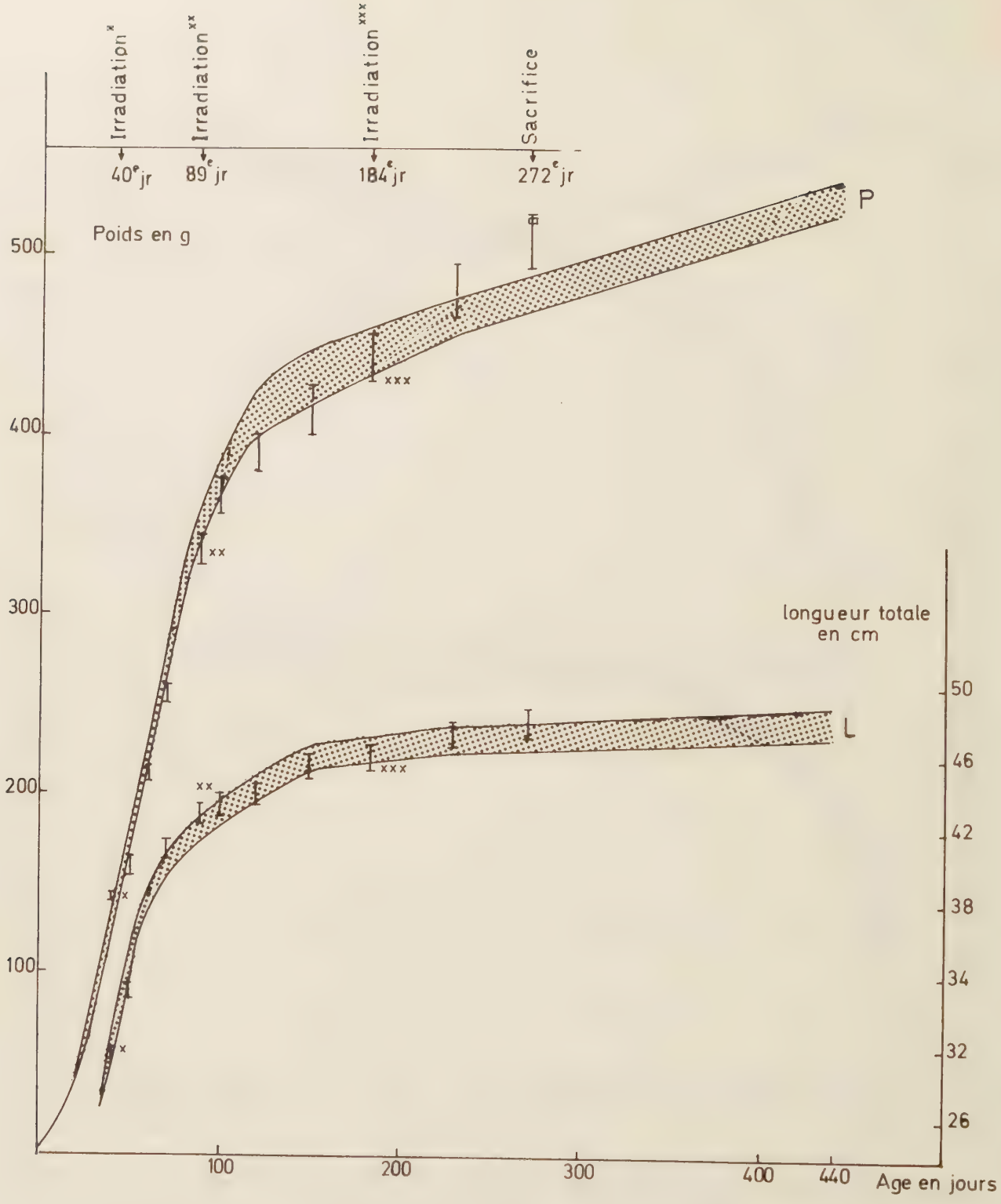


Figure III.2c - Variations du poids et de la longueur totale en fonction de l'âge de quatre mâles OFA irradiés trois fois.

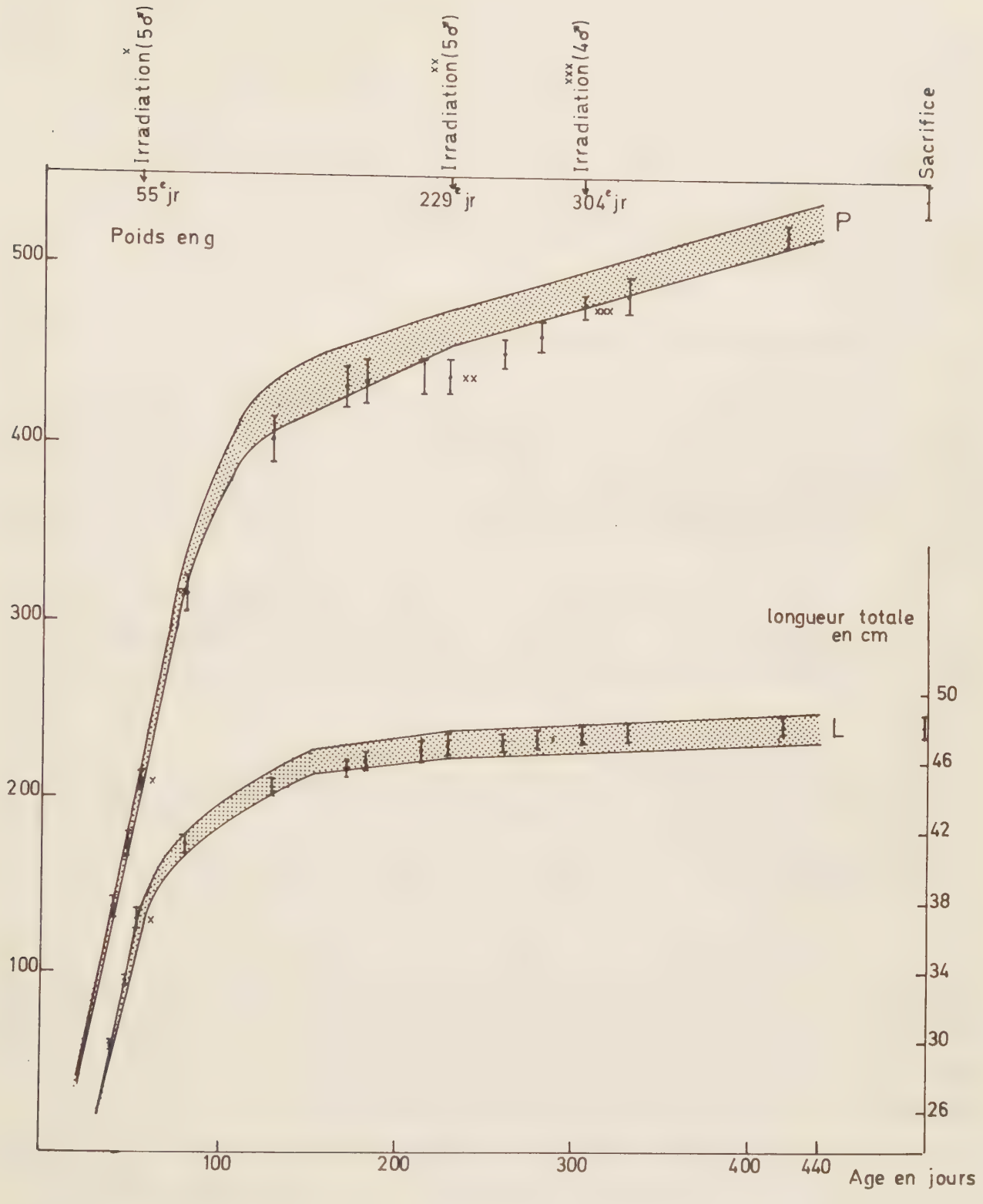


Figure III.2d - Variations du poids et de la longueur totale en fonction de l'âge d'un lot de mâles OFA irradiés trois fois.

A partir du 120ème jour la croissance du squelette est très lente chez la femelle. Toutefois les modifications de la taille chez le mâle restent encore sensibles jusqu'au 200ème jour. A partir de cet âge la croissance se poursuit, très lentement, au même rythme pour les deux sexes. Vers le 440ème jour les femelles mesurent quarante quatre centimètres (dont dix huit centimètres de queue) et les mâles quarante huit centimètres (dont vingt centimètres de queue).

1.2 - Croissance des animaux irradiés

Les figures III.1 (b,c et d) et III.2 (b,c et d) correspondent à trois exemples de la croissance des animaux soumis à l'expérimentation. Ils concernent le lot 1 qui comprend les animaux irradiés les plus jeunes et les lots 2 et 3 (3 irradiations successives).

Chez tous les autres lots, après un bref arrêt, consécutif à l'irradiation, la croissance pondérale et l'accroissement du squelette ne présente aucune différence signigicative avec celles des témoins.

2. Etude de la composition en azote, chlore, phosphore et calcium, en fonction de l'âge et du sexe

2.1 - à la suite d'une irradiation de neuf lots de rats

Les courbes de la figure III.3 concernent l'évolution des masses d'azote, de chlore, de calcium et de phosphore chez la femelle et chez le mâle en fonction de l'âge. Elles ont été tracées à partir des valeurs moyennes $\pm \sigma$. Pour un âge donné l'écart-type représente non seulement l'erreur expérimentale mais aussi les variations individuelles. C'est la raison pour laquelle les limites des courbes ont été déterminées à partir des plus grands écarts à la moyenne.

Au 35ème jour l'azote représente :
chez la femelle 2,5 % $\pm$ 0,6 et
chez le mâle 2,65% $\pm$ 0,6 de la masse corporelle. La rétention azotée augmente avec l'âge puis se stabilise vers 90 jours

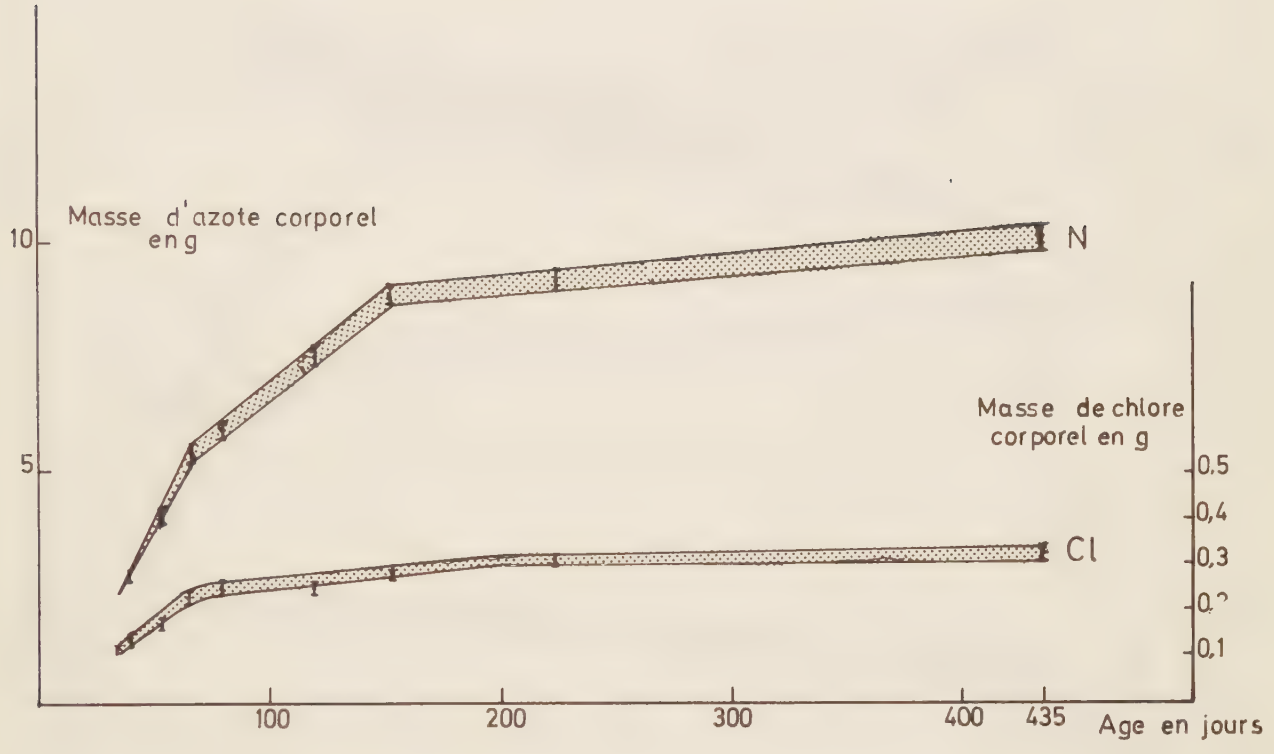


Figure III.3a - Evolution en fonction de l'âge des masses corporelles d'azote et de chlore chez la femelle OFA.

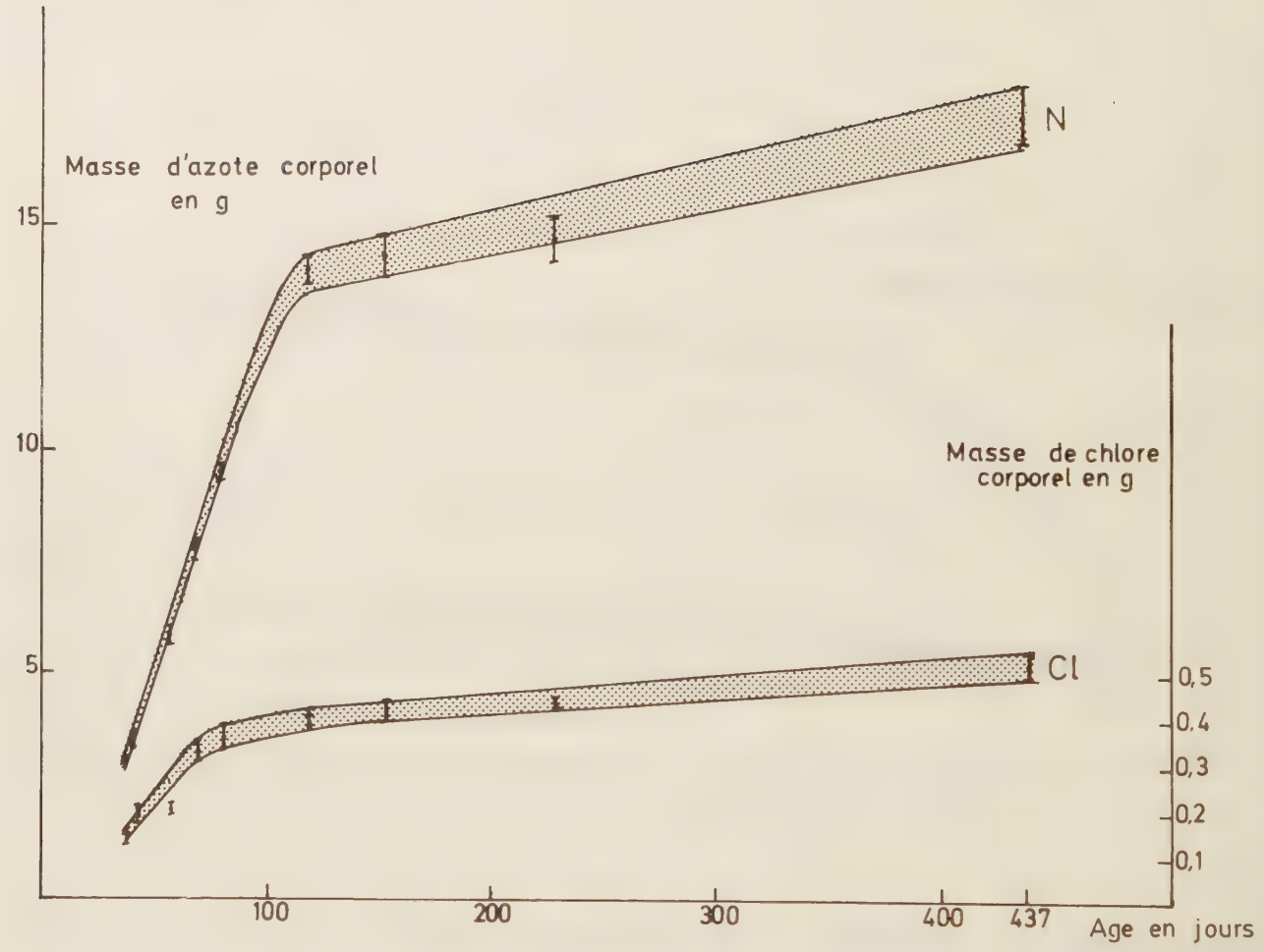


Figure III.3b - Evolution en fonction de l'âge des masses corporelles d'azote et de chlore chez le mâle OFA.

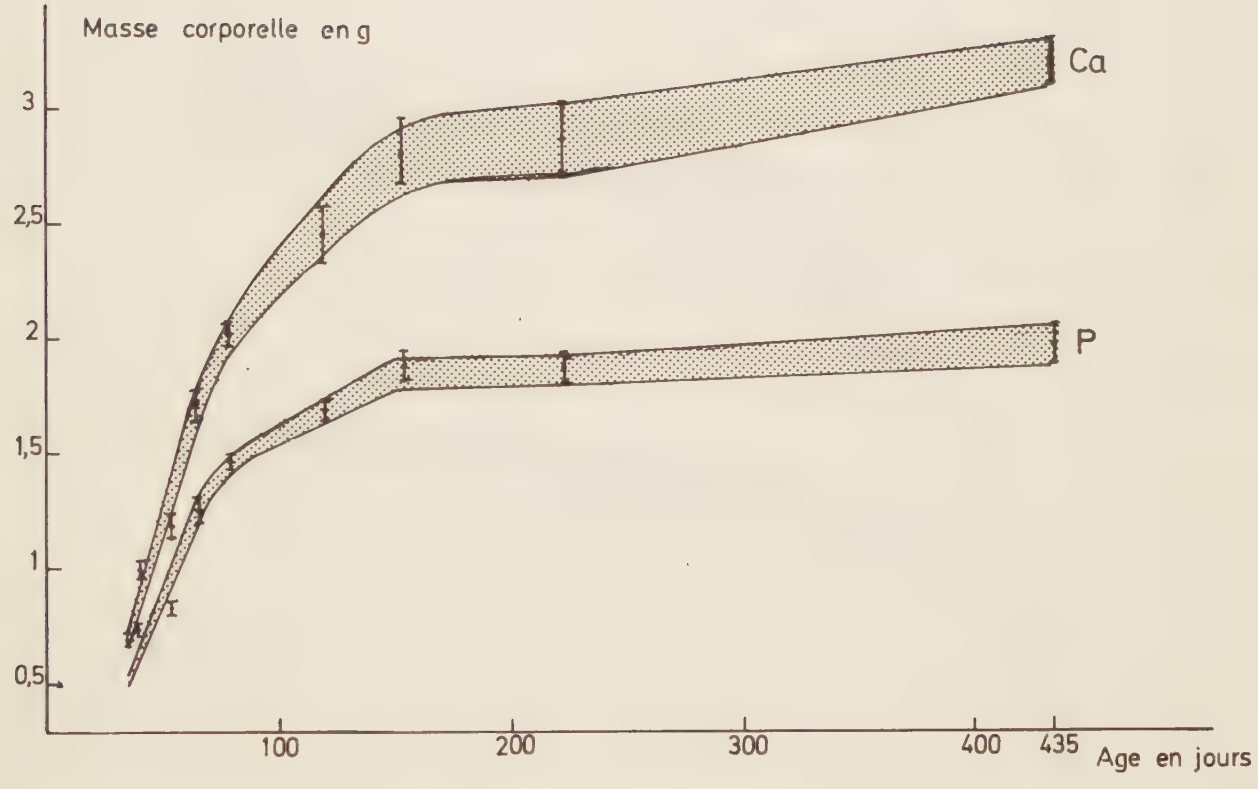


Figure III.3c - Evolution en fonction de l'âge des masses corporelles de calcium et de phosphore chez la femelle OFA.

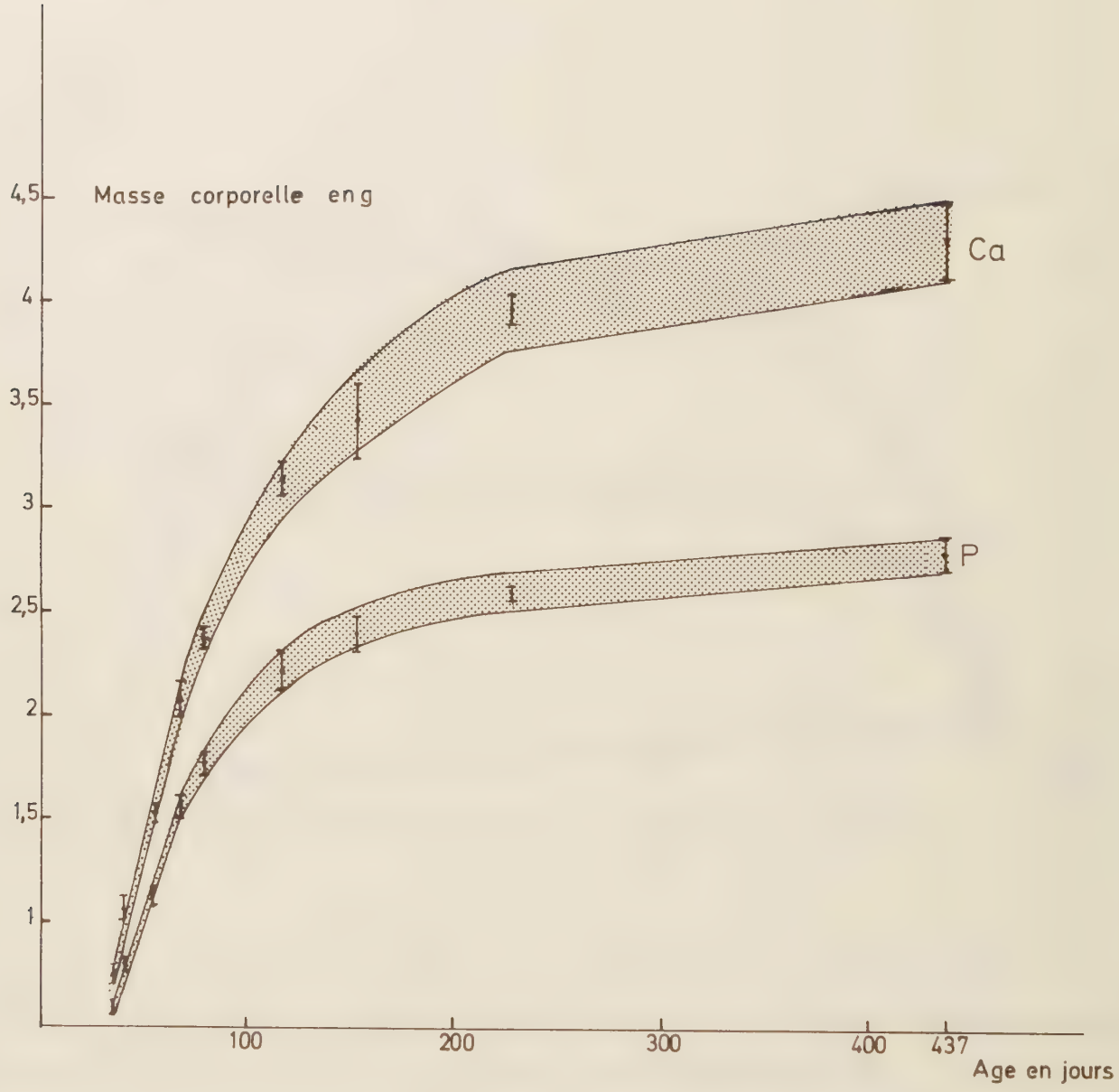


Figure III.3d - Evolution en fonction de l'âge des masses corporelles de calcium et de phosphore chez le mâle OFA.

pour les femelles et vers 100 jours pour les mâles. A partir de cet âge, dans l'organisme des animaux analysés, il y a 3,14 % ± 0,09 d'azote chez la femelle et 3,28 % ± 0,1 chez le mâle. Ces différences ne sont pas significatives. Chez l'adulte l'azote représente 3,2 % du poids du corps.

Au cours de la croissance, le chlore contenu dans l'organisme du rat évolue en sens inverse de l'azote. En effet au 35ème jour cet élément représente chez la femelle 0,13 % ± 0,01 et chez le mâle 0,125 % ± 0,01 de la masse corporelle. Entre le 90ème et le 100ème jour, le chlore n'occupe plus que 0,103 % ± 0,003 du poids du corps chez la femelle et 0,097 % ± 0,002 chez le mâle. Ces chiffres représentent une valeur moyenne constante pour les deux sexes de 0,1 %.

Des quatre éléments étudiés chez le rat, le phosphore est celui dont la concentration est la plus précocement stabilisée. En effet, le niveau maximum de 0,55 % ± 0,02 est obtenu chez le mâle vers 40 jours. Chez la femelle le phosphore représente 0,66 % ± 0,02 du poids corporel vers 60 jours.

L'évolution du calcium en fonction de l'âge est le reflet, pour 99 % du calcium corporel, de la croissance du squelette. La concentration en calcium de l'organisme augmente donc pendant toute la phase intensive du développement. Ce n'est que vers 120 jours pour la femelle et 150 jours pour le mâle que la concentration peut être considérée comme constante. Cet élément représente alors 1 % ± 0,03 du poids du corps chez la femelle et 0,82 % ± 0,04 chez le mâle.

Ainsi l'analyse par radioactivation neutronique montre que l'azote et le chlore ne sont pas significativement différents chez le mâle et chez la femelle. Par contre dès le 35ème jour, âge auquel ont été analysés les animaux les plus jeunes, le calcium et le phosphore sont en concentrations plus élevées chez la femelle. L'écart entre les valeurs obtenues pour l'adulte (1 % et 0,82 % pour le calcium - 0,66 % et 0,55 % pour le phosphore) correspond aux valeurs publiées /108/.

2.2 - Etude de la composition corporelle à la suite d'irradiations répétées sur un même animal

Trois irradiations d'un même animal réparties sur toute la durée de l'étude ont été pratiquées. La composition en azote, chlore, calcium et phosphore des rats mâles appartenant aux lots 2 et 3 est donnée dans la figure III.4 (a,b,c et d). Rapportées au poids du corps, les masses des quatre éléments déterminées par radioactivation neutronique, ne sont pas significativement différentes de celles mesurées à la suite d'une seule irradiation de lots d'âges croissants.

On a d'autre part étudié l'incidence de la reproduction sur la composition de l'organisme maternel (Figure III.5 (a,b,c et d) les conséquences de cet évènement ont été analysées à la fin de la lactation chez les femelles du lot 2 (3ème irradiation) puis cinquante et cent-trente jours après le sevrage chez les femelles du lot 3 (2ème et 3ème irradiation)) .

Les valeurs individuelles données sur les figures permettent d'apprécier l'importance des pertes phosphocalciques de la mère.

Elles sont en moyenne de :

- 13 % pour le calcium et 11 % pour le phosphore à la fin de la lactation,
- 9 % pour le calcium et 6 % pour le phosphore, cinquante jours après le sevrage,
- totalement compensées cent trente jours après le sevrage.

III - DISCUSSION

1. Incidence de la diète et des irradiations neutroniques sur la croissance du rat OFA

1.1 - Incidence de la diète

Tous les rats utilisés au cours de cette étude ont été soumis à un régime alimentaire riche contenant 9,2 mg de calcium et de phosphore par gramme de nourriture et 4 U.I/g de vitamine D_3 .

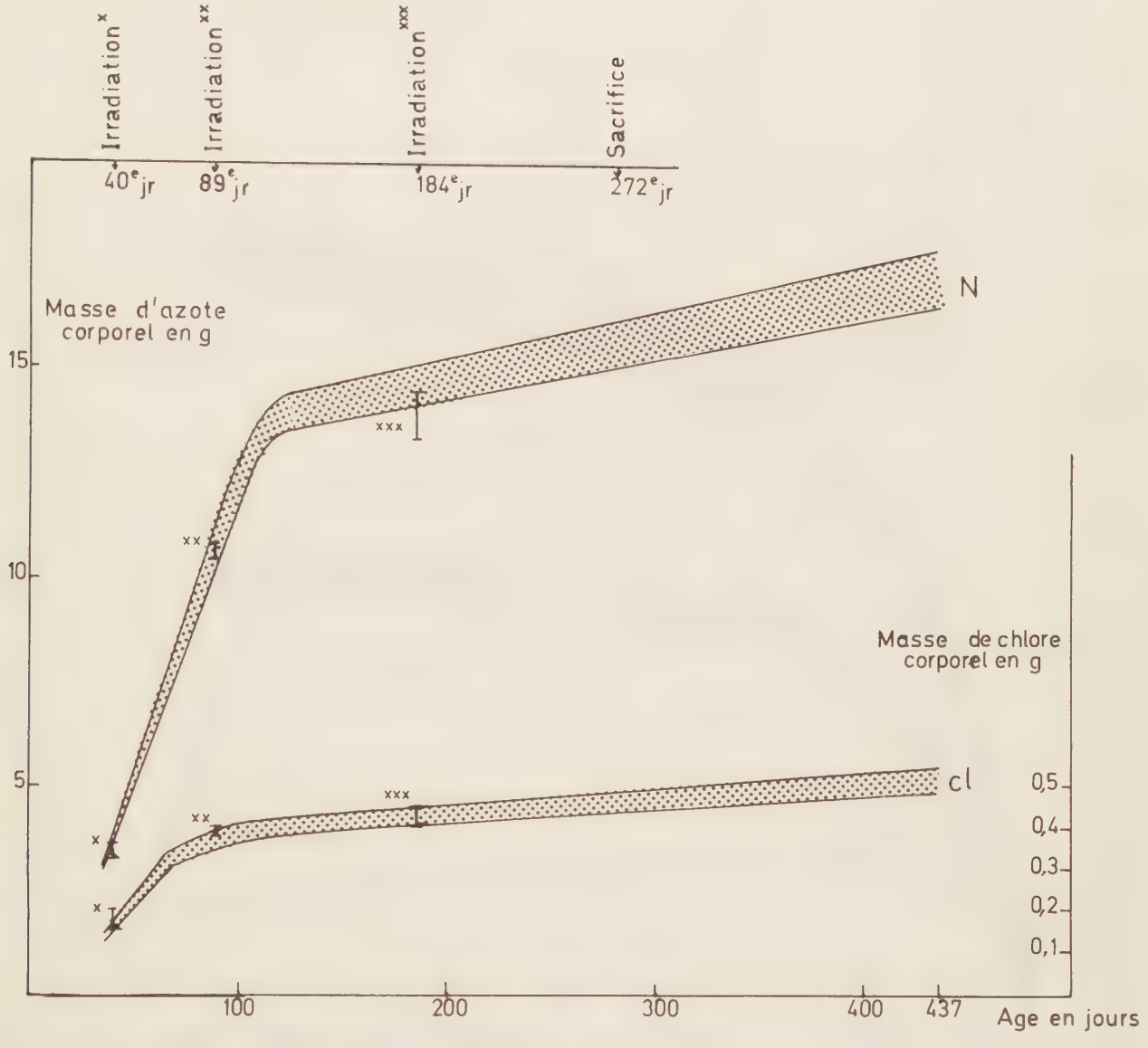


Figure III.4a - Evolution en fonction de l'âge des masses corporelles d'azote et de chlore chez quatre mâles OFA irradiés trois fois.

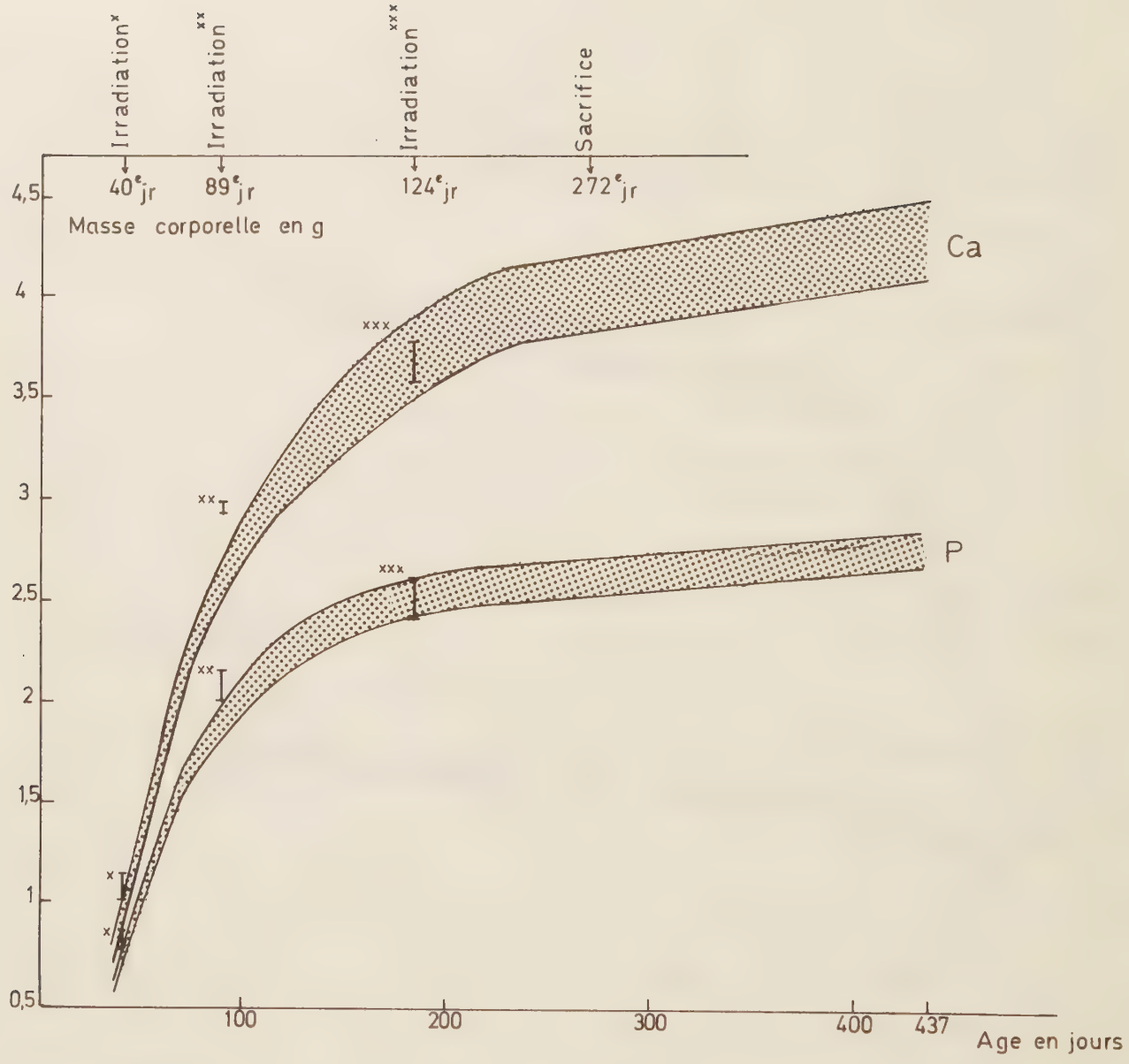


Figure III.4b - Evolution en fonction de l'âge des masses corporelles de calcium et de phosphore chez quatre mâles OFA irradiés trois fois.

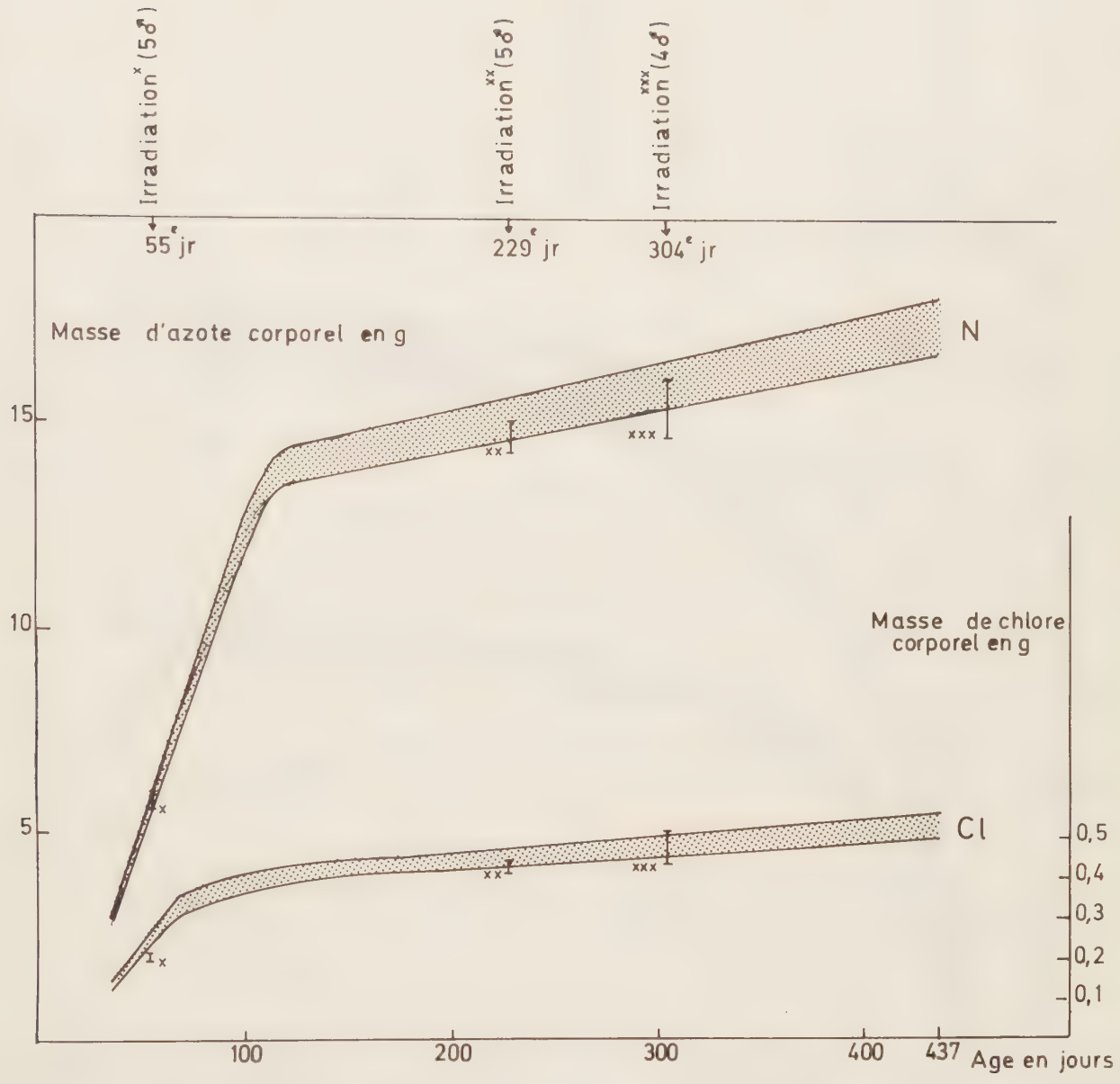


Figure III.4c - Evolution en fonction de l'âge des masses corporelles d'azote et de chlore chez un lot de mâles OFA irradiés trois fois.

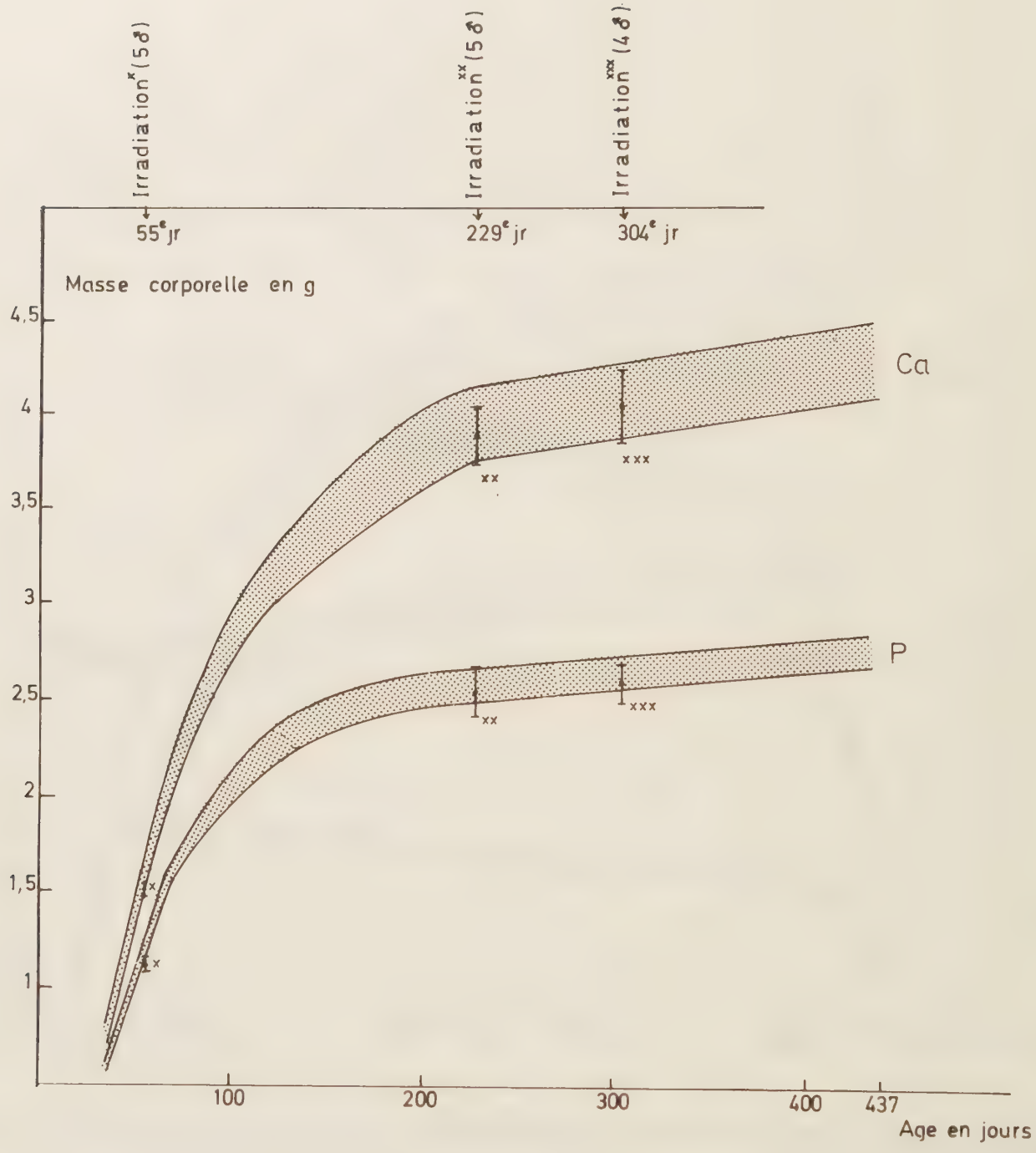


Figure III.4d - Evolution en fonction de l'âge des masses corporelles de calcium et de phosphore chez un lot de mâles OFA irradiés trois fois.

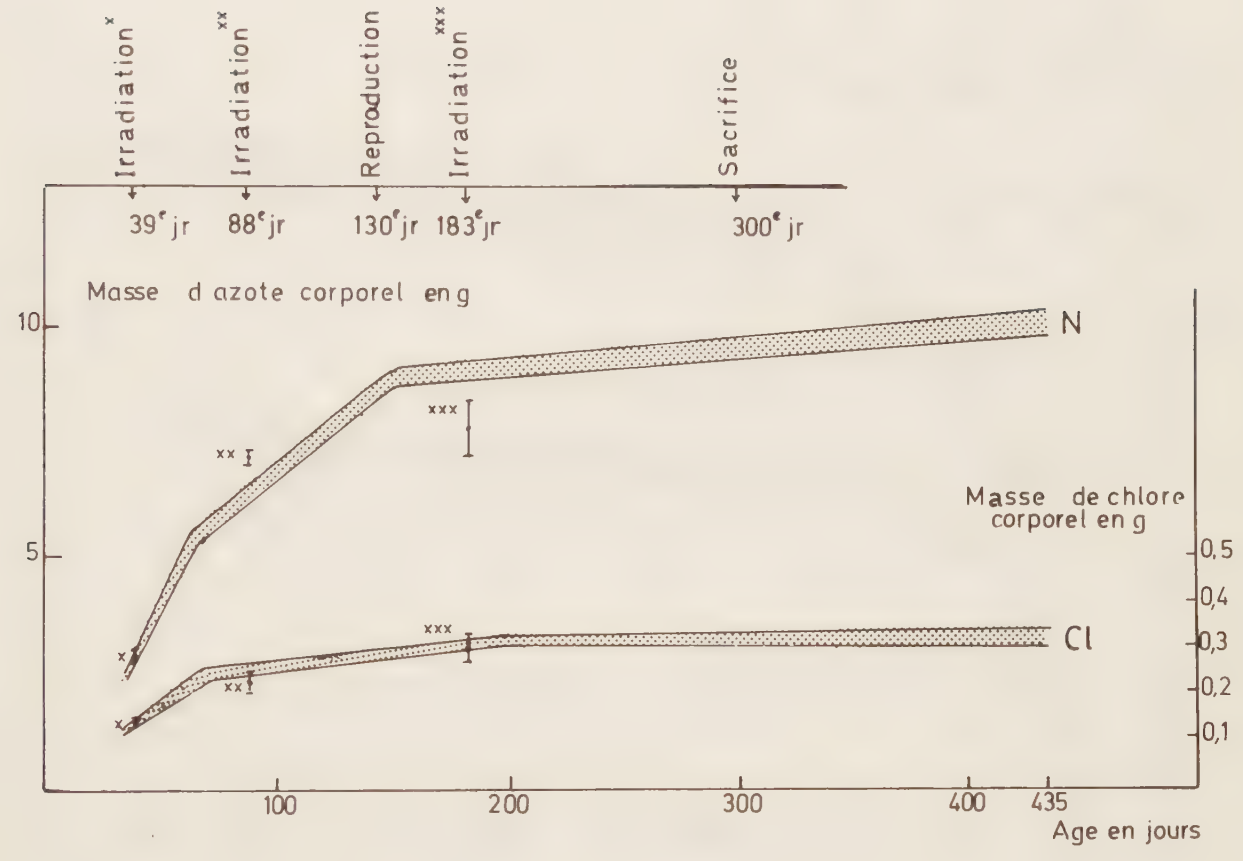


Figure III.5a - Evolution en fonction de l'âge des masses corporelles d'azote et de chlore chez quatre femelles OFA irradiées trois fois.

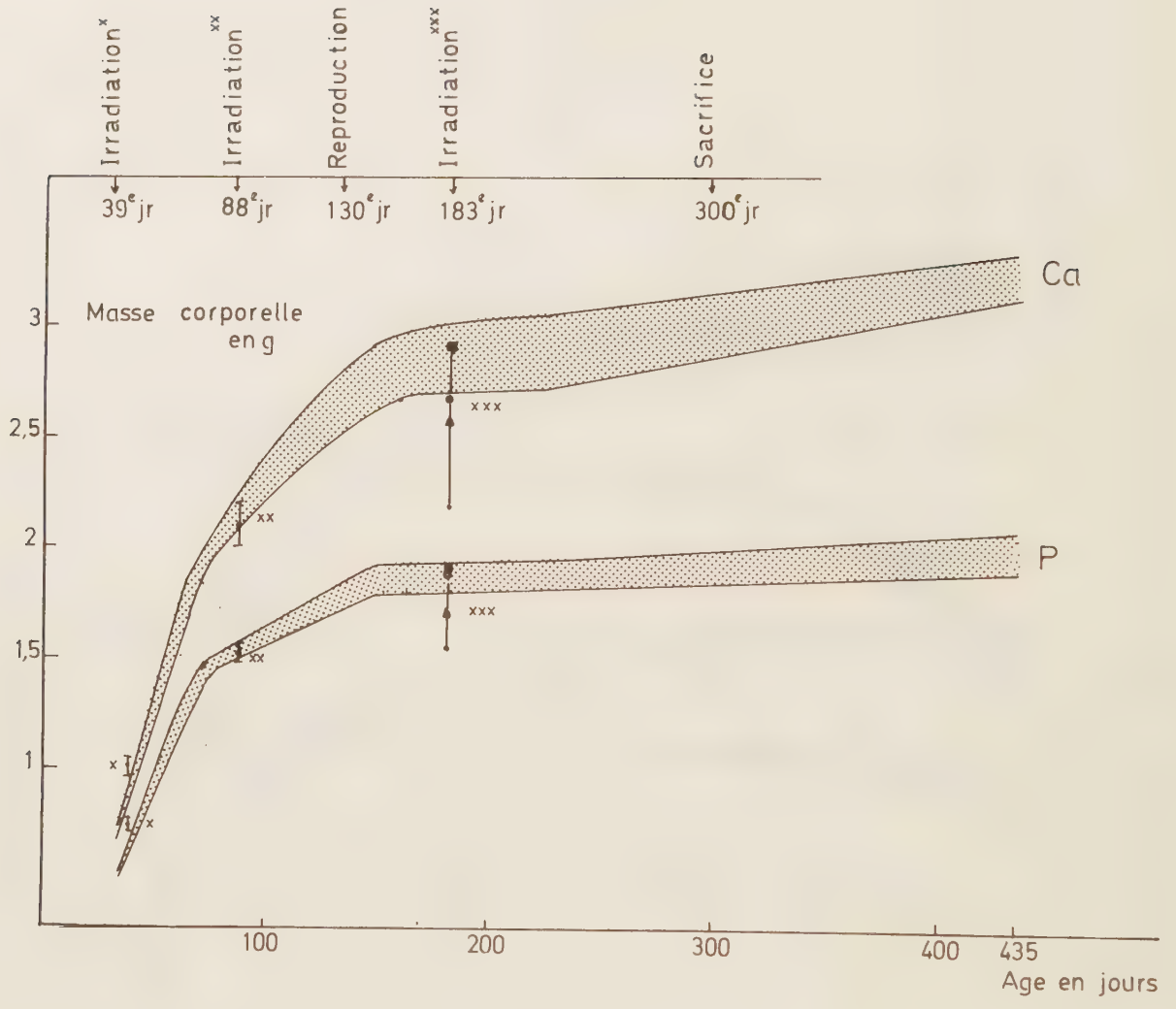


Figure III.5b - Evolution en fonction de l'âge des masses corporelles de calcium et de phosphore chez quatre femelles OFA irradiées trois fois.

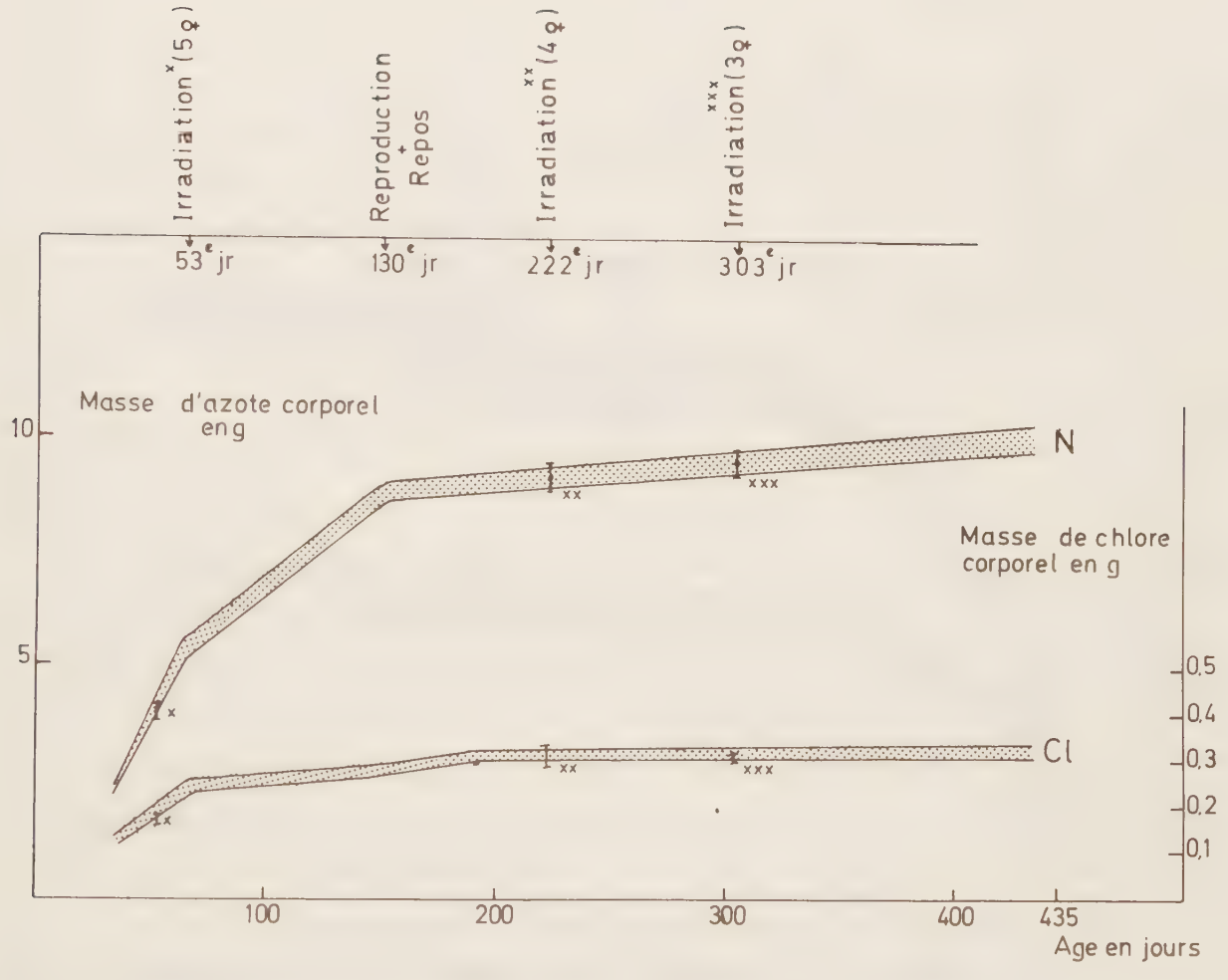


Figure III.5c - Evolution en fonction de l'âge des masses corporelles d'azote et de chlore chez un lot de femelles OFA irradiées trois fois.

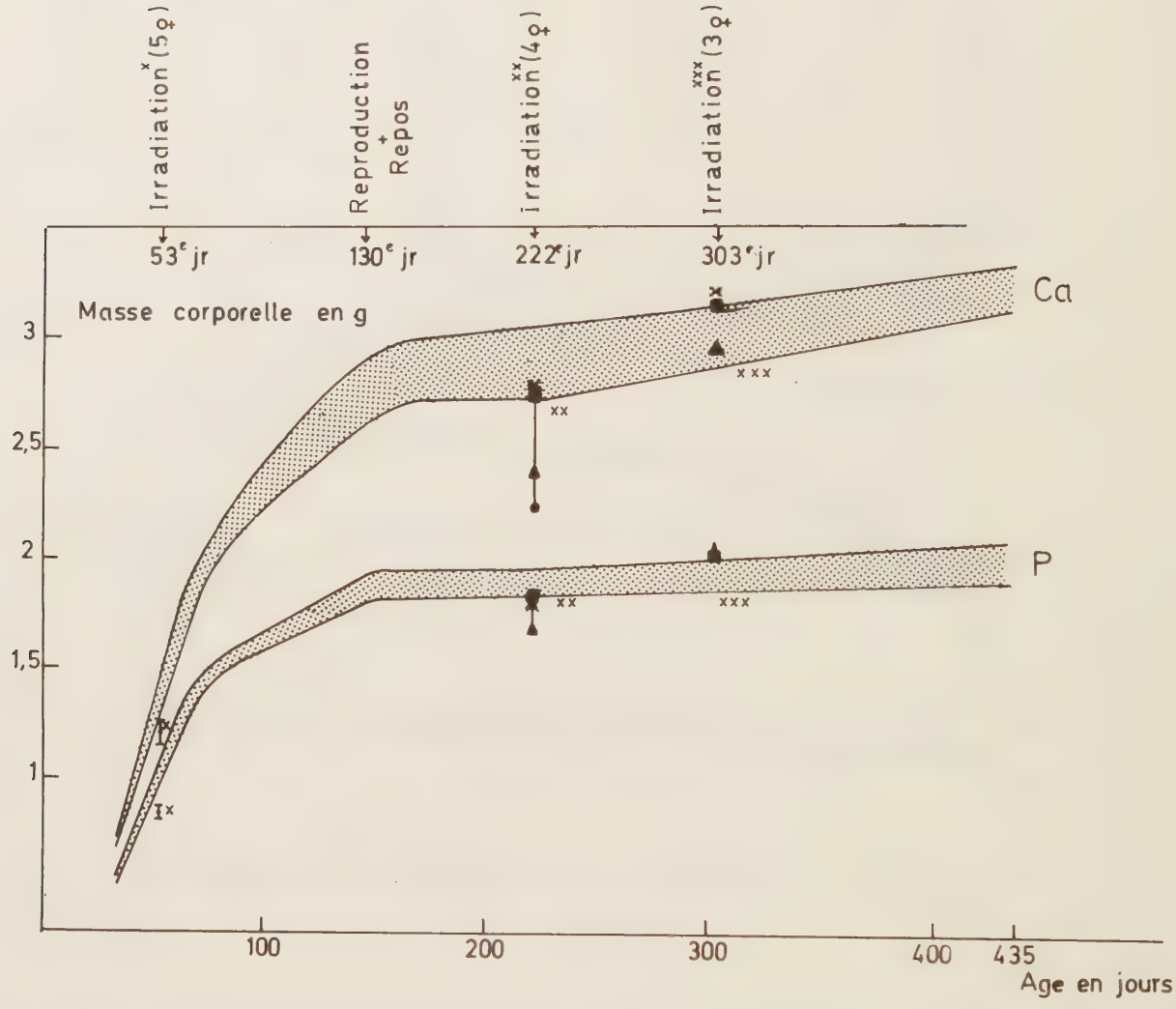


Figure III.5d - Evolution en fonction de l'âge des masses corporelles de calcium et de phosphore chez un lot de femelles OFA irradiées trois fois.

C'est en 1939 que DAY et M. COLLUM /37/ ont montré qu'un régime carencé en phosphate entraîne de sévères perturbations du métabolisme phosphocalcique chez le rat en croissance. Par contre selon BRONNER et AUBERT /15/ une diète pauvre en calcium n'affecte pas immédiatement l'homéostasie calcique. Toutefois, au bout d'un certain temps, les besoins essentiels de l'organisme perturbent l'édification du squelette et entraînent une forte résorption osseuse.

Le rapport Ca/P de l'alimentation affecte à la fois l'absorption intestinale et l'excrétion urinaire de ces deux éléments. Il est généralement admis que si l'un est donné en excès l'excrétion de l'autre se trouve augmentée.

Une diète "adéquate" représente le support normal de la croissance et de la reproduction.

Une diète "optimale" est celle qui favorise la croissance et entraîne une maturité plus précoce. Elle joue également sur le taux de fécondité.

Les travaux de CARTTAR et col. /19/ permettent de préciser ces données. Le rapport Ca/P de la diète adéquate doit être compris, selon cet auteur, entre 0,5 et 1. Les teneurs doivent être de 0,2 à 0,4 % pour le calcium et de 0,4 % pour le phosphore.

Le rapport Ca/P de la diète optimale peut varier entre 1 et 2. Ce régime doit cependant contenir de 0,64 à 1,44 % de calcium et de 0,4 à 1,06 % de phosphore.

Un des aspects les plus importants de la diète est son action sur le contrôle hormonal exercé par la thyroïde et les parathyroïdes. COPP et KUCZERPA /32 et 33/ ont étudié cet effet chez des rats mâles âgés de trente-deux jours et soumis à une injection soit de parathormone soit de calcitonine.

L'action de la parathormone est considérablement réduite chez les animaux soumis à un régime carencé en phosphate. La réponse optimale se rencontre chez les rats qui ont une alimentation à rapport Ca/P = 1 et dont la teneur en calcium est égale ou supérieure à 0,4 %.

La réponse hypocalcémiante attribuée à la calcitonine est réduite chez les rats dont la diète contient peu de phosphate. Par contre, elle est optimale lorsque le régime fourni contient de 0,4 à 0,8 % de phosphore et relativement peu de calcium.

Bien que la vitamine D puisse être synthétisée par l'organisme au niveau de la peau, un apport alimentaire est indispensable à la croissance. Elle favorise l'absorption intestinale du calcium et du phosphate. Toutefois l'action de la vitamine sur le transport du calcium est indépendante de ses effets sur le phosphate /1 et 69/. Au niveau du rein, l'administration de cholecalciferol (D_3) diminue l'excrétion du phosphate à la fois chez le rat normal, rachitique ou thyroparathyroïdectomisé /47-87/. Au niveau osseux, l'action de la vitamine est complexe. D_3 et ses métabolites ($25\text{-}(OH)D_3$ et $1,25\text{-}(OH)_2D_3$) augmentent la synthèse du collagène et la minéralisation. Elle permet également le départ du calcium de l'os et contribue au maintien de l'homéostasie calcique.

Tout ceci explique l'influence du régime sur l'évolution du poids et de la stature des rats OFA.

En effet, nous avons vérifié que c'est à partir de 130 jours environ que les femelles soumises à la diète présentent des poids supérieurs à ceux des femelles de même souche soumises au régime d'entretien IFFARAT. A partir de 200 jours les courbes de croissance sont parallèles. Vers 440 jours, les poids moyens des femelles appartenant à ces deux lots sont respectivement de 320 grammes (♀ nourries avec le régime U.A.R. n°103) et de 295 grammes (♀ nourries avec le régime IFFARAT).

Cette action est encore plus sensible chez le mâle. En effet, c'est vers 90 jours que les animaux soumis au régime U.A.R. n° 103 présentent des poids moyens supérieurs à ceux des rats élevés au régime IFFARAT. Vers 440 jours les poids sont respectivement de 530 grammes et de 480 grammes. A cet âge les animaux des deux groupes mesurent en moyenne 48 et 45,5 centimètres.

Pour une même souche une alimentation appropriée accélère à la fois la prise de poids et la croissance du squelette. A 440 jours ces gains peuvent être estimés à :

- 6 % pour le poids et 4,5 % pour la taille chez la femelle,

- 10 % pour le poids et 5 % pour la taille chez le mâle.

Ces résultats imputables à la diète peuvent être généralisés à des rats appartenant à des souches différentes.

Nous avons comparé les courbes de croissance pondérales et structurales obtenues dans les conditions expérimentales suivantes:

- Rats ♂ Wistar soumis au régime U.A.R. n°103
- Rats ♂ OFA soumis au régime IFFARAT
- Rats ♂ Wistar soumis au régime IFFARAT.

Soumis au régime IFFARAT les rats OFA ont des poids et une taille légèrement plus élevés que ceux des rats Wistar de même diète.

Les mâles Wistar et OFA soumis au régime U.A.R. n°103 ont des croissances comparables. Cette importante prise de poids chez des mâles issus de souches différentes n'est pas totalement imputable à la surcharge graisseuse qui est de règle au cours de la deuxième année de vie. Des autopsies de mâles OFA âgés de 350 à 500 jours et soumis aux deux régimes (U.A.R. n°103 et IFFARAT) ont été pratiquées. Le tissu adipeux, qui envahit progressivement la région sous-cutanée et la cavité abdominale est plus important chez les animaux soumis au régime d'entretien. Il semble donc que la prise de poids régulière, à partir de 200 jours, des mâles OFA recevant une alimentation riche (Figure III.2a) doit être attribuée non seulement à la surcharge graisseuse mais aussi à un accroissement des tissus mous.

1.2 - Incidence des irradiations répétées sur la croissance

Pour les deux sexes, le choc que représente l'anesthésie, la double rotation et dix minutes d'irradiation a peu d'incidence sur la prise de poids et la croissance du squelette (Figure III.2b).

Pendant la gestation et la lactation, la croissance du squelette est pratiquement nulle. Ceci explique la légère différence de taille qui existe entre les femelles du lot 1 et des femelles non soumises à la reproduction (Figure III.1b).

Les irradiations répétées ont été faites sur un trop petit nombre d'animaux pour que les résultats soient significatifs. Cependant on peut remarquer :

- chez les mâles du lot 2 (Figure III.2c) un très léger fléchissement de la croissance pondérale après la première irradiation et de la croissance du squelette après la seconde. Après la troisième irradiation une reprise généralisée de la croissance s'amorce. Elle est supérieure à celle de l'ensemble des témoins mais reste inférieure à celle des rats issus de la même portée et non irradiés.

- chez les mâles du lot 3 (Figure III.2d) il faut noter une accélération de la croissance pondérale après la seconde irradiation.

- chez les femelles du lot 2 (Figure III.1c) c'est à la reproduction et à la lactation, plus qu'à la seconde irradiation, que l'on doit vraisemblablement attribuer l'arrêt momentané de la croissance du squelette. Cependant après la troisième irradiation, le poids moyen de ces animaux reste inférieur à celui des femelles témoins (non soumises à la reproduction) et à celui des femelles qui ont eu des petits et n'ont pas été irradiées. Ce retard doit être imputé aux tumeurs qui apparaissent vers 270 jours et peut-être aux irradiations.

- chez les femelles du lot 3 (Figure III.1d) la croissance du squelette se ralentit à la suite de la première irradiation, de la reproduction et de la lactation. Toutefois entre 220 et 300 jours, la taille des femelles de ce lot n'est pas significativement différente de celle des femelles témoins ayant eu des portées. La croissance pondérale, qui subit un léger ralentissement à la suite de la première irradiation, rejoint très rapidement celle des témoins. Il faut cependant remarquer, à partir de la troisième irradiation, un arrêt complet de la croissance. Comme pour les femelles du lot 2 les tumeurs qui apparaîtront vers 380 jours en sont très vraisemblablement responsables.

2. Discussion des résultats obtenus

2.1 - à la suite de l'irradiation unique d'animaux groupés en différents lots

a) Evolution de la teneur corporelle en azote et en chlore en fonction de l'âge et du sexe

L'analyse chimique de nouveaux-nés appartenant à différentes espèces (Homme, porc, chien, chat, lapin, rat et souris) a permis à WIDDOWSON et à DICKERSON /39 et 108/ de mettre en évidence la très faible teneur azotée du rat (chez l'enfant : 22,6 g/kg - chez le rat 15,6 g/kg libre de graisse). A l'âge adulte, l'eau et l'azote ont des concentrations comparables d'une espèce à l'autre (Homme : 34 g d'azote/kg - rat : 35 g/kg libre de graisse).

Il est généralement admis que la composition de la masse corporelle (excluant les graisses) à la maturité est relativement constante non seulement à l'intérieur d'une même espèce mais aussi pour l'ensemble du règne animal. Cette hypothèse, partiellement vraie, ne peut être étendue aux constituants inorganiques dont les concentrations varient considérablement d'une espèce à l'autre. Cette disparité ne peut être entièrement expliquée par les variations de la masse du squelette. Elle reflète également un comportement physiologique différent.

A la naissance, l'immaturité physiologique du jeune rat se traduit par sa composition chimique. Au cours de la croissance, l'élévation constante de la concentration en azote s'accompagne d'une baisse sensible de l'eau corporelle. Le phénomène permet d'apprécier l'intensité de la synthèse des protéines.

A partir de 120 jours, l'azote représente 3,2 % du poids du corps. L'estimation du pourcentage de graisse contenue dans les tissus est difficile. Cependant à cet âge, la valeur moyenne la plus couramment admise est de 9 %. Ainsi 3,5 % d'azote entrent dans la composition des tissus libres de graisse. Ce chiffre correspond aux données publiées /108/.

Associé au sodium, le chlore contrôle les mouvements de l'eau et maintient la pression osmotique à l'intérieur de l'organisme. La concentration en chlore du rat nouveau-né est de 2,38 g/kg libre de graisse /108/. Au cours du développement, elle diminue considérablement. WIDDOWSON et McCANCE l'estiment à 1,42 g/kg libre de graisse chez l'adulte. Cependant les travaux de COTLOVE et HOGBEN /34/ permettent de penser, qu'à la maturité, l'organisme du rat contient 1,08 g de chlore/kg.

Déterminée par radioactivation neutronique, la valeur moyenne de la concentration en chlore à partir de 90 jours est de 1 g/kg chez les deux sexes.

L'espace Cl^- d'un tissu ou d'un organisme représente le volume apparent de distribution du chlore qui s'y trouve présent. C'est le rapport de la masse de Cl^- contenu dans le tissu ou dans l'organisme considéré à la concentration en Cl^- de l'eau plasmatique. L'hypothèse que l'ion chlore est préférentiellement localisé dans le liquide extracellulaire a permis d'utiliser fréquemment la notion d'espace Cl^- comme une mesure approchée du volume extracellulaire.

Toutefois, une interprétation plus précise du volume occupé par le liquide extracellulaire a été donnée par MANERY, DANIELSON et HASTINGS /72/ et plus récemment par NICHOLS et ses collaborateurs /79/. Pour ces auteurs, le liquide extracellulaire comprend : l'eau plasmatique, l'eau interstitielle et l'eau contenue dans le tissu conjonctif. L'eau interstitielle représente le volume de liquide qui s'équilibre rapidement avec des substances telle que l'inuline. L'eau du tissu conjonctif correspond au volume d'eau associé au collagène et à des substances qui s'équilibrent lentement avec l'inuline. Ainsi ces trois compartiments peuvent être raisonnablement définis par l'espace chlore à condition de soustraire à cette mesure le chlore intracellulaire.

Chez le rat, les travaux de CHEEK, WEST et GOLDEN /23/ permettent de penser que 87,3 % de la masse totale du chlore sont présents dans le liquide extracellulaire. Selon ces auteurs, chez un rat mâle pesant 220 grammes, le volume occupé par ce liquide est de 47,4 ml ce qui représente 21,5 % du poids du corps. A partir de ces résultats, le volume occupé par le liquide extracellulaire chez un rat mâle OFA pesant 220 grammes a été calculé. Le chlore total représente 0,106 % de la masse corporelle. Le volume du liquide extracellulaire est de 46,3 ml soit 21 % du poids du corps.

b) Evolution de la teneur corporelle en calcium et en phosphore en fonction de l'âge et du sexe

ASPECT THEORIQUE DU PROBLEME OSSEUX

L'évolution du calcium et du phosphore en fonction de l'âge reflète les modifications de la structure et de la composition

du squelette pour la plus grande partie du calcium et pour environ 80 % du phosphore de l'organisme.

Tissu hétérogène, l'os est constitué d'une partie organique, la matrice, riche en fibres de collagène et d'une partie minérale qui se présente sous deux formes :

- un phosphate de calcium de structure amorphe,
- une partie cristallisée proche de l'apatite.

Selon RICHELLE, les relations probables entre les différents matériaux présents dans l'os peuvent être précisées à l'aide du schéma suivant :

C'est à partir du calcium amorphe décrit par EANES et ses col. /40/ qu'apparaît une première cristallisation rapide. Ce précipité cristallin, dont la composition est proche d'un phosphate octocalcique, représente l'intermédiaire nécessaire à la formation du cristal d'hydroxyapatite. L'os est également le siège d'un phénomène plus lent qui permet à l'hydroxyapatite de se former à la fois à partir du matériau amorphe et de la phase liquide. Les carbonates existent au moins sous deux formes chimiques et leurs proportions dans l'os varient avec l'âge.

D'après les observations de DEAKINS /38/ et de ROBINSON /89/ dans un volume constant de tissu calcifié la quantité de matériel organique ne change pas. L'eau est remplacée volume par volume par des éléments minéraux. L'os serait donc formé d'une population hétérogène de volumes élémentaires. L'évolution d'un tel système, au cours du temps, a été étudiée par RICHELLE chez le rat. Le modèle mathématique proposé permet d'exprimer le nombre de volumes formés, détruits ou présents à un âge donné. Pour RICHELLE la taille du cristal d'apatite varie peu en fonction du temps. Seul le nombre croissant de cristaux entraîne une augmentation de la charge minérale du squelette. Selon POSNER /86/ la taille du cristal n'est pas figée. Elle varie d'une espèce animale à l'autre. De plus, pour une espèce donnée, des modifications peuvent apparaître non seulement en fonction des différentes catégories osseuses qui composent le squelette mais aussi en fonction de l'âge, de la diète et de l'état pathologique de l'organisme étudié.

La minéralisation est généralement considérée comme la dernière étape de la formation du squelette après la différenciation cellulaire et la constitution de la matrice. Les liquides qui baignent l'os contiennent Ca^{++} et PO_4^{--} en solution métastable et des polyphosphates. Des pyrophosphates, en effet, ont été identifiés à la fois par CARTIER /18/, HERMAN et DALLEMAGNE /60/, FRANCOIS et HERMAN /45/ et impliqués dans la biochimie osseuse. En 1961, FLEICH et NEUMAN /43/ ont démontré, in vitro, que ces pyrophosphates sont susceptibles d'inhiber la calcification. L'action d'une pyrophosphatase lève localement l'inhibition et permet la minéralisation. Malheureusement cette enzyme, comme la phosphatase alcaline postulée par ROBINSON, existe dans beaucoup de tissus minéralisés ou non. Les travaux d'ANDERSON et de ses collaborateurs révèlent la présence de vésicules capables d'accumuler le calcium dans la matrice intracellulaire de l'os. Ces vésicules, visibles en microscopie électronique, possèdent des systèmes enzymatiques susceptibles d'augmenter localement la concentration d'orthophosphate. Elles pourraient favoriser la formation initiale d'hydroxyapatite et engendrer la formation de la matrice cartilagineuse. Il semble donc improbable que seuls les mécanismes extracellulaires soient concernés dans le processus de la calcification. En effet jusqu'en 1969, les théories de la calcification ont été étudiées en fonction des phénomènes physiques. A l'inverse, les travaux récents tendent à mettre en évidence l'importance des mécanismes cellulaires au niveau osseux.

En effet, EANES et POSNER /41/ considérent que le phosphate de calcium amorphe est un produit de l'activité cellulaire. Plus soluble que l'apatite, ce matériau contrôlerait la concentration en calcium et en phosphore du liquide qui baigne l'os et permettrait aussi la formation de la phase cristalline. De plus, d'après OWEN et col. /81/, les glycoprotéines et l'albumine jouent un rôle dans la calcification. Enfin BORLE /14/ accorde au calcium intracellulaire une influence importante dans la régulation de l'homéostasie. En effet la faible concentration du calcium ionique intracellulaire (10^3 fois moins que le calcium extracellulaire) est en équilibre avec le calcium lié aux mitochondries. Cette réserve de calcium intracellulaire pourrait jouer un rôle primordial dans le mécanisme de l'action hormonale, de l'homéostasie et même de la calcification.

L'eau forme une partie importante du squelette. C'est elle qui lui permet à la fois de conserver ses propriétés élastiques et de prendre part aux échanges métaboliques indispensables à sa croissance et à son renouvellement.

La fixation et le départ du calcium osseux liés aux phénomènes physiologiques de catabolisme et d'anabolisme assurent le renouvellement du squelette au cours du temps. C'est à AUBERT et MILHAUD /5-6-75/ que l'on doit la mise au point d'une méthode qui permet de mesurer l'intensité de ces différents processus. Le taux de formation osseuse est soumis au contrôle hormonal. Toutefois l'hormone somatotrope, la tyroxine, les oestrogènes et la testostérone jouent un rôle secondaire. L'os est un des organes cibles de la parathormone et de la calcitonine. En fait, le rôle joué par ces deux hormones au niveau du squelette ne représente qu'une partie de leur action. Elles contrôlent également l'homéostasie phosphocalcique.

Les schémas proposés pour rendre compte de l'état homéostatique du calcium et du phosphore sanguin postule la constance du taux de ces deux éléments aux erreurs inhérentes à tout système biologique près. A toute variation non physiologique du milieu intérieur, les systèmes hormonaux concernés réagissent pour annuler la perturbation par des mécanismes dits de "feed-bach". Selon les auteurs, l'homéostasie phosphocalcique, c'est à dire la régulation à chaque instant de la calcémie et de la phosphatémie, serait préférentiellement assurée par des échanges rapides os-liquide extracellulaire . La construction de l'os résulterait de mécanismes plus lents d'accrétion et de résorption. Le modèle proposé par COPP /32 et 33/ illustre bien l'action antagoniste de la parathormone et de la calcitonine à la fois sur l'os et sur le maintien de l'homéostasie. Ce schéma ne tient compte que des changements morphologiques produits par le contrôle hormonal et n'explique pas l'importance des paramètres physiologiques. En effet le liquide extracellulaire a un taux de calcium et de phosphore ionisé plus élevé que celui qui existe dans la phase liquide de l'os.

En 1956 HOWARD /62/ avait suggéré qu'une couche de cellules réparties sur toute la surface osseuse pourrait isoler le fluide osseux du milieu intérieur. GEISLER et NEUMAN en 1969 /46/ ont

démontré l'existence physico-chimique de ce compartiment. Les travaux de TALMAGE /73-99-100/ ont précisé l'origine de ces cellules. Issues des ostéoblastes, reliées aux ostéocytes par de fins canalicules, elles recouvrent l'ensemble du squelette et forment un réseau dans l'os compact lui-même.

Dans un tel environnement, la parathormone, selon TALMAGE /101/, pourrait :

- stimuler l'activité des ostéoclastes pour permettre le renouvellement de l'os.
- permettre au calcium ionisé de franchir la barrière formée par le complexe ostéocyte-ostéoblaste et ainsi d'être déversée dans le liquide extra-cellulaire.

Sur un plan plus général, la parathormone augmente l'entrée du calcium dans les cellules pour accroître l'intensité des processus métaboliques et permet le transfert calcique au niveau de l'os de l'intestin et du rein vers le plasma.

Agent hypocalcémiant et hypophosphatémiant, la calcitonine inhibe la résorption osseuse et élève l'excrétion urinaire. HIRSH et COOPER /61/ ont montré le rôle important joué par le phosphate inorganique dans ce contrôle hormonal. Au niveau osseux, d'après KENNEDY et TALMAGE /68/ l'action de la calcitonine est liée, d'une façon ou d'une autre, à la sortie du phosphate des cellules. Ainsi l'hypocalcémie peut être considérée comme la conséquence de l'action de l'hormone sur le phosphate qui inhibe le transfert calcique vers le plasma. En fait, le rôle physiologique de la calcitonine n'est pas encore complètement élucidé.

Respectant, dans la mesure du possible des habitudes naturelles de vie, PERAULT-STAUB, STAUB et MILHAUD /84 et 85/ ont mis en évidence l'inconstance de la calcémie et de la phosphatémie chez le jeune rat. Ces deux paramètres fluctuent selon un rythme circadien. En conséquence, la constance du milieu intérieur et l'homéostasie ne représentent qu'un aspect particulier dans un système de régulation qui est l'homéostasie généralisée.

L'évidence d'un rythme journalier dans le système phosphocalcique permet d'envisager une nouvelle dynamique physiologique. Propriété fondamentale de tout système vivant, aussi bien à l'échelle

d'un organisme in toto qu'à celle d'une cellule, il permet d'envisager au niveau de l'homéostasie ou de la calcification des perspectives basées sur une parfaite synchronisation des évènements cellulaires ou hormonaux.

EVOLUTION DU RAPPORT EN POIDS Ca/P CORPOREL ET OSSEUX EN FONCTION DE L'AGE ET DU SEXE

L'évolution chez le rat du rapport Ca/P corporel, en fonction de l'âge, a été analysée par SHERMANN et QUINN /93/. A la naissance, il est de 0,78, s'élève rapidement puis reste sensiblement égal à 1,29 pendant toute la croissance pubertaire. Lorsque le développement est complet, il est de 1,55. Selon ces auteurs, 99 % du calcium et 80 % du phosphore de l'organisme se trouvent fixés sur le squelette. Pour SPRAY et WIDDOWSON /96/ chez le rat nouveau-né, les valeurs obtenues à partir d'analyses chimiques sont respectivement de 0,84 et 0,86.

Un mâle et une femelle OFA appartenant à une portée de dix petits ont été analysés par radioactivation neutronique. Le rapport Ca/P ainsi déterminé est de 0,81 pour la femelle et de 0,82 pour le mâle.

A partir des masses totales de calcium et de phosphore déterminées in vivo chez des rats OFA âgés de 35 à 435 jours les rapports Ca/P ont été calculés. Ces résultats donnés dans les tableaux III.3 et III.4 mettent en évidence :

- chez la femelle aucune variation significative entre le 34ème et le 78ème jour à l'exception du lot analysé au 53ème jour qui présente une valeur élevée. A partir de la fin de la période pubertaire le rapport Ca/P corporel augmente progressivement pour atteindre 1,55 au 435ème jour.

- chez le mâle la valeur calculée pour les animaux âgés de 35 jours est beaucoup plus basse que celle calculée pour les femelles de même âge.

Entre le 40ème et le 79ème jour le rapport Ca/P corporel présente peu de variations significatives à l'exception du lot analysé au 55ème jour.

Age des lots étudiés	Calcium total en g	Phosphore total en g	Phosphore extra osseux en g	$\frac{Ca}{P}$ corporel	$\frac{Ca}{P}$ corporel	Références $\frac{Ca}{P}$ osseux
4 ♀ 34 jours	0,69±0,04	0,5 ±0,01	0,135±0,001	1,37 ±0,03	1,89 ±0,04	1,91 à 30 j
4 ♀ 39 jours	1,01±0,04	0,74±0,03	0,20 ±0,001	1,365±0,06	1,87 ±0,09	
5 ♀ 53 jours	1,19±0,06	0,83±0,03	0,22 ±0,01	1,43 ±0,02	1,95 ±0,03	1,98 à 50 j
5 ♀ 64 jours	1,72±0,1	1,17±0,06	0,34 ±0,02	1,36 ±0,04	1,85 ±0,05	1,98 à 65 j
3 ♀ 78 jours	2,03±0,05	1,47±0,03	0,40 ±0,01	1,37 ±0,02	1,90 ±0,03	1,99 à 75 j
6 ♀ 118 jours	2,45±0,1	1,70±0,06	0,46 ±0,02	1,44 ±0,05	1,97 ±0,05	2,02 à 100j
6 ♀ 152 jours	2,82±0,1	1,88±0,07	0,51 ±0,02	1,50 ±0,05	2,048±0,08	2,055 à 150j
4 ♀ 222 jours	2,87±0,2	1,87±0,06	0,50 ±0,02	1,52 ±0,05	2,082±0,06	2,075 à 225j
5 ♀ 435 jours	3,22±0,1	2,08±0,1	0,56 ±0,03	1,55 ±0,04	2,125±0,06	2,10 à 435j

Références 1) Travaux de HAMMET - Mineral Metabolism Volume II p.92.
2) 225 et 435 jours - Analyses destructives par radioactivation

Tableau III.3 - EVOLUTION DU RAPPORT $\frac{Ca}{P}$ EN FONCTION DE L'AGE CHEZ LA ♀ OFA

Age des lots étudiés	Calcium total en g	Phosphate total en g	Phosphore extra osseux en g	$\frac{Ca}{P}$ corporel	$\frac{Ca}{P}$ osseux	Références $\frac{Ca}{P}$ osseux
5 ♂ à 35 jours	0,74 ±0,05	0,58±0,03	0,16±0,01	1,27±0,02	1,76±0,02	1,88 à 30 j
4 ♂ à 40 jours	1,075±0,08	0,81±0,03	0,22±0,01	1,32±0,05	1,81±0,03	
5 ♂ à 55 jours	1,52 ±0,04	1,12±0,04	0,30±0,01	1,36±0,02	1,86±0,04	1,96 à 50 j
4 ♂ à 67 jours	2,075±0,1	1,56±0,05	0,42±0,01	1,33±0,03	1,82±0,05	1,96 à 65 j
3 ♂ à 79 jours	2,375±0,03	1,76±0,06	0,47±0,01	1,35±0,03	1,84±0,05	1,99 à 75 j
6 ♂ à 117 jours	3,15 ±0,1	2,22±0,1	0,60±0,03	1,42±0,07	1,94±0,07	2,025 à 100j
5 ♂ à 153 jours	3,41 ±0,2	2,39±0,09	0,64±0,03	1,42±0,06	1,95±0,06	2,025 à 150j
4 ♂ à 228 jours	3,96 ±0,07	2,60±0,02	0,70±0,01	1,52±0,02	2,08±0,03	2,07 à 230j
5 ♂ à 437 jours	4,3 ±0,2	2,78±0,09	0,75±0,02	1,54±0,02	2,12±0,04	2,09 à 440j

Références - 1) Travaux de HAMMET - Mineral Metabolism Volume II p.92

2) 230 et 440 jours - analyses destructives par radioactivation.

Tableau III.4 - EVOLUTION DU RAPPORT $\frac{Ca}{P}$ EN FONCTION DE L'AGE CHEZ LE ♂ OFA

L'augmentation importante entre le 79ème et le 117 ème jour, se stabilise entre le 117ème jour et le 153ème jour. A partir de cet âge la progression est constante et atteint vers le 220ème jour des valeurs identiques à celles des femelles.

Compte tenu de l'importance du phosphore extra osseux chez le rat, ces résultats ne permettent pas d'apprécier les modifications du squelette en fonction de l'âge. Il faut donc déterminer le pourcentage de phosphore extra-osseux. Il est admis que l'analyse des os longs reflète la composition élémentaire du squelette. La connaissance des modifications de la composition chimique des os longs durant la croissance du rat date des travaux de HAMMET /54 et 55/. La charge minérale du fémur et de l'humérus augmente avec l'âge. Chez les deux sexes, elle est légèrement supérieure dans l'humérus et pour la femelle les teneurs en éléments minéraux tels que le calcium, le phosphore et le magnésium sont toujours plus fortes. HAMMET considère que le développement chimique des os est presque terminé à la fin de la période pubertaire c'est à dire vers 75 jours. Confirmés plus récemment par DICKERSON et WIDDOWSON /39/ ces résultats nous permettent de connaître le rapport Ca/P osseux chez des rats âgés de 23 à 150 jours. D'autre part, la détermination du rapport Ca/P osseux a été faite à partir d'analyses par radioactivation neutronique de tibia, fémur et péroné appartenant à des animaux âgés respectivement de 225 et 435 jours. Le phosphore extra-osseux des femelles et des mâles OFA analysés à l'âge adulte représente 27 % du phosphore total.

Si, quel que soit l'âge du rat, 99 % du calcium et 73 % du phosphore entrent dans la composition du squelette, on peut aisément, à partir des masses totales de ces deux éléments, en déterminer le rapport au niveau osseux et suivre son évolution (Tableaux III.3 et III.4). La comparaison de ces résultats avec ceux obtenus par analyse destructive devrait permettre de justifier cette hypothèse couramment formulée. Nous devons également admettre que la composition des os longs peut être rapportée à l'ensemble du squelette.

- chez la femelle les valeurs obtenues ne sont pas très différentes de celles citées en référence sauf pendant la période pubertaire.

- par contre, chez le mâle, pendant toute la phase active de la croissance les rapports Ca/P osseux sont un peu plus faibles que ceux calculés pour les os longs.

Un autre aspect du problème doit être envisagé. Il concerne le taux apparemment constant du phosphore extra osseux au cours du développement.

La variation circadienne de la calcémie et de la phosphatémie du jeune rat paraît incompatible avec la régulation à tout instant de l'homéostasie phosphocalcique. Dans les conditions expérimentales utilisées /76/, la valeur normale de la calcémie varie au cours du nycthémère d'environ 10 %. Mais, à tout moment, cette valeur demeure ajustée à 0,1 mg % près. La variation de la phosphatémie est double de la calcémie. En fait le système de contrôle aboutit au maintien d'une rythmicité apparemment constante, mais susceptible de s'adapter aux besoins de l'organisme.

Cependant, au niveau sanguin, les mouvements de ces deux composants ne sont pas liés. Les travaux de KENNEDY et de TALMAGE /68 et 73/ ont montré que les modifications de la calcémie et de la phosphatémie en réponse à une injection de calcitonine sont à la fois indépendants l'un de l'autre et variables. L'effet hypocalcéminant de l'hormone est proportionnel à la concentration plasmatique en phosphate lorsque celle-ci est comprise, chez le rat, entre six et treize mg P/100 ml. On peut expérimentalement créer des conditions dans lesquelles la calcitonine affecte la phosphatémie et le taux de sortie du phosphate de l'os sans effets concomitants sur le calcium. Selon KENNEDY et TALMAGE les thyrocalcitonines, à des taux physiologiques, agissent principalement sur le phosphate. Les mouvements du calcium ne sont que secondairement affectés. Certes le rôle joué par le calcium reste déterminant. Il peut en effet, former avec des protéines des complexes réversibles qui changent les caractéristiques des membranes et aident à la contraction musculaire. Il peut également être mis en réserve au niveau des mitochondries. Cependant tout agent affectant l'entrée du calcium dans les cellules devient, par nature, un facteur actif de la régulation. Ce rôle est principalement dévolu à la parathormone. Cependant, à travers l'action de la calcitonine, il peut partiellement être joué par le phosphate.

Le problème posé par la croissance permet d'analyser l'action de l'hormone somatotrope. Il semble, qu'au niveau du squelette son rôle se borne au maintien d'un facteur sérique qui permet la synthèse du collagène. Au niveau des tissus mous elle est anabolisante. En effet, en stimulant le RNA elle favorise la synthèse des protéines. Pendant la phase de croissance intensive elle contribue à augmenter le taux de phosphate sanguin. Ceci a été démontré en étudiant l'acromégalie qui, chez l'homme, est provoquée par une hypersécrétion de l'hormone somatotrope. Ce désordre hormonal entraine une élévation importante de la phosphatémie /2/.

Pendant la croissance, les besoins de l'organisme pour l'édification des tissus et la maturation des glandes sexuelles sont accrus. Or le phosphore sous forme d'A.T.P. et d'acides nucléiques permet cet anabolisme intensif.

HENRI et KON /58 et 59/ ont étudié, chez le rat en croissance, les effets d'une diète carencée en phosphore. Très rapidement, au niveau du squelette, la balance entre l'accrétion et la résorption devient négative. Pour ces auteurs, pendant la croissance, les besoins en phosphore des tissus mous sont prioritaires. La résorption osseuse provoquée par la diète apporte le supplément de phosphore nécessaire à leur formation.

Il semble donc difficile de postuler une valeur constante du phosphore extra osseux pendant la croissance. En effet l'écart le plus important entre les valeurs du rapport Ca/P osseux calculées pour le rat OFA à partir d'un phosphore extra-osseux constant et celles citées en référence se situe pendant la puberté. Cet écart est de 4 % chez les femelles et de 5 % chez les mâles. Il peut refléter en partie, au niveau de l'organisme, la demande accrue des tissus mous pendant cette période. Cependant, à partir de 150 jours, le phosphore extra-osseux, estimé chez les deux sexes par des analyses du membre inférieur, représente 27 % du phosphore total soit 0,16 % des tissus mous chez le mâle et 0,19 % chez la femelle. Cette valeur est très élevée.

Certes 10 % d'erreur expérimentale sur la mesure du phosphore total entraine 100 % d'erreur dans la détermination du phosphore extra-osseux. Dans notre cas, une erreur de 3 à 5 % expliquerait ce résultat. A partir de 50 jours environ, le phosphore chez

le mâle, représente 0,55 % de la masse corporelle. CHEEK et col. /23/ l'estiment à 0,56 %. Chez la femelle, à partir de 60 jours, 0,66 % de la masse corporelle est constitué par du phosphore.

A partir de 150 jours chez le mâle, le calcium représente 0,82 % du poids du corps contre 1 % chez la femelle à partir de 120 jours.

Selon SPRAY /97/ les concentrations en calcium et phosphore de femelles âgées de 225 à 320 jours seraient respectivement de 1,08 % et de 0,62 %.

Il semble donc que les résultats obtenus dans la détermination du calcium par radioactivation neutronique soient inférieurs de 8% environ à ceux cités par différents auteurs. C'est à cette erreur expérimentale possible que l'on devrait alors attribuer l'estimation élevée du phosphore extra-osseux.

Cependant la diète peut, à la fois par sa composition et par ses effets sur la croissance, modifier ces résultats. Vers 230 jours, cinq femelles Wistar, soumises à un régime "d'entretien" ont été analysées in vivo. Le rapport Ca/P osseux du membre inférieur, déterminé par radioactivation neutronique est de 2,10. Le phosphore extra-osseux représente 23,5 % du phosphore total (0,65 % du poids du corps) et le calcium 1,06 % de la masse corporelle. A 225 jours, soumises à une diète "de croissance" les femelles OFA ont un rapport Ca/P osseux de 2,08. Leur organisme contient 1 % de calcium et 0,64 % de phosphore.

En fait, la mesure des masses corporelles totales de calcium et de phosphore pratiquée par radioactivation neutronique ne peut être que le reflet de tendances complexes qui au niveau du squelette contrôlent la minéralisation osseuse. Dans ces conditions, les modifications du rapport Ca/P telles que nous pouvons les étudier au niveau osseux permettent d'apprécier des phénomènes physiques plus que des mécanismes cellulaires. Durant la croissance un phénomène rapide qui affecte le volume osseux prédomine. Chez l'adulte, les modifications de la densité, phénomènes lents, semblent plus importants.

A partir d'un sel amorphe, l'os néoformé tendrait vers une structure moléculaire proche d'un phosphate tricalcique hydraté

(9 Ca/6 PO_4 en poids = 1,94). La pénétration du calcium facilement échangeable à l'intérieur de la molécule de phosphate fondamentale correspondrait au cours du temps à la formation d'hydroxyapatite (10 Ca/6 PO_4 = 2,15).

Il reste à expliquer la relative stabilité du rapport Ca/P osseux pendant la phase pubertaire chez les deux sexes. Les hormones sexuelles paraissent avoir peu d'action sur la formation osseuse. Cependant LINDQUIST et col. /71/ ont remarqué que chez de jeunes rats traités aux oestrogènes, l'accrétion et la résorption osseuse s'équilibraient. Durant la puberté, la construction du squelette, l'édification des tissus mous et la maturation sexuelle entrent en compétition. La conjonction de ces trois évènements ne peut favoriser la recristallisation de la matrice osseuse. De plus une concentration légèrement plus élevée de phosphore extra osseux peut être un facteur limitant à la fixation du calcium sur le squelette.

2.2 - à la suite d'irradiations répétées sur le même animal au cours de la croissance

a) Chez le mâle

Les irradiations répétées permettent de suivre sur un même animal l'évolution en fonction de l'âge des masses corporelles des éléments étudiés et ainsi de vérifier les résultats obtenus par radioactivation neutronique sur différents lots.

La rétention azotée, reflet de l'accumulation des protéines au cours de la croissance, entraine une réduction progressive du volume occupé par le liquide extra-cellulaire. Ces résultats confirment ceux précédemment obtenus à la suite d'une irradiation.

Les modifications des rapports Ca/P corporels et osseux, au cours du temps sont données dans le Tableau III.5 . Les rapports Ca/P osseux ont été calculés comme pour les autres animaux, à partir du phosphore extra osseux supposé constant (27 % du phosphore total). La croissance et la minéralisation progressive du squelette ne semblent pas être significativement affectées par trois irradiations.

Tableau III.5 - Evolution du rapport $\frac{Ca}{P}$ en fonction de l'âge chez 4 ♂ OFA

1ère irradiation 40e jour					2ème irradiation 89e jour					3ème irradiation 184e jour				
Poids en g	Ca en g	P en g	$\frac{Ca}{P}$ corporel	$\frac{Ca}{P}$ osseux	Poids en g	Ca en g	P en g	$\frac{Ca}{P}$ corporel	$\frac{Ca}{P}$ osseux	Poids en g	Ca en g	P en g	$\frac{Ca}{P}$ corporel	$\frac{Ca}{P}$ osseux
141	1,07	0,83	1,29	1,75	329	2,98	2,11	1,41	1,93	425	3,61	2,44	1,48	2,03
142	0,99	0,77	1,293	1,77	336,5	2,96	1,99	1,48	2,04	454	3,59	2,34	1,53	2,10
144	1,16	0,83	1,40	1,92	336	2,95	2,02	1,46	2	441	3,82	2,61	1,46	2,01
145,5	1,08	0,82	1,31	1,80	345	2,93	2,17	1,35	1,84	450	3,72	2,66	1,40	1,92
M 143	1,075	0,81	1,32	1,81	336,5	2,95	2,075	1,42	1,95	443	3,68	2,51	1,47	2,01
σ ±2	±0,08	±0,03	±0,05	±0,03	±8	±0,02	±0,08	±0,06	±0,09	±14	± 0,1	±0,1	±0,06	±0,08

Evolution du rapport $\frac{Ca}{P}$ en fonction de l'âge chez des ♂ OFA

1ère irradiation 55e jour					2ème irradiation 229e jour					3ème irradiation 304e jour				
Poids en g	Ca en g	P en g	$\frac{Ca}{P}$ corporel	$\frac{Ca}{P}$ osseux	Poids en g	Ca en g	P en g	$\frac{Ca}{P}$ corporel	$\frac{Ca}{P}$ osseux	Poids en g	Ca en g	P en g	$\frac{Ca}{P}$ corporel	$\frac{Ca}{P}$ osseux
201,5	1,47	1,065	1,38	1,91	430	3,79	2,51	1,51	2,07	471	4,16	2,73	1,52	2,09
203	1,56	1,17	1,34	1,81	425	4	2,54	1,57	2,16	pas de 3ème irradiation - Tumeur				
205	1,52	1,11	1,37	1,88	440	3,90	2,60	1,50	2,05	479	3,82	2,55	1,50	2,06
212	1,545	1,11	1,39	1,91	448	4,07	2,73	1,49	2,04	483	4,25	2,76	1,54	2,10
215	1,505	1,13	1,33	1,81	445	3,73	2,49	1,50	2,05	482	4,03	2,60	1,55	2,12
M 207,5	1,52	1,12	1,36	1,86	437	3,9	2,57	1,51	2,07	479	4,06	2,61	1,52	2,09
σ ±6	±0,04	±0,04	±0,02	±0,04	±10	±0,15	±0,1	±0,03	±0,05	±5	±0,2	±0,1	±0,02	±0,03

Tableau III.6 - Evolution du rapport $\frac{Ca}{P}$ en fonction de l'âge chez 4 $\frac{0}{+}$ OFA

1ère irradiation 39e jour					2ème irradiation 88e jour					3ème irradiation 183e jour				
Poids en g	Ca en g	P en g	$\frac{Ca}{P}$ corporel	$\frac{Ca}{P}$ osseux	Poids en g	Ca en g	P en g	$\frac{Ca}{P}$ corporel	$\frac{Ca}{P}$ osseux	Poids en g	Ca en g	P en g	$\frac{Ca}{P}$ corporel	$\frac{Ca}{P}$ osseux
106	0,98	0,70	1,40	1,91	203	2,05	1,46	1,40	1,91	246,5 15 petits	2,18	1,53	1,42	
113	1,02	0,77	1,32	1,81	227	1,96	1,48	1,32	1,81	268 0	2,91	1,90	1,53	2,09
114	0,98	0,75	1,31	1,78	226	2,12	1,55	1,37	1,88	269,5 9 petits	2,66	1,86	1,43	
117	1,06	0,74	1,43	1,96	230	2,26	1,55	1,46	2	280 14 petits	2,57	1,69	1,52	
M 113	1,01	0,74	1,365	1,87	221,5	2,1	1,51	1,39	1,91	266,1	3 2,47	1,69	1,47	
$\sigma \pm$	$\pm$0,04	$\pm$0,03	$\pm$0,06	$\pm$0,09	$\pm$13	$\pm$0,1	$\pm$0,04	$\pm$0,07	$\pm$0,1	$\pm$16	$\pm$0,31	$\pm$3,2	$\pm$0,05	

Evolution du rapport $\frac{Ca}{P}$ en fonction de l'âge chez des $\frac{0}{+}$ OFA

1ère irradiation 53e jour					2ème irradiation 222e jour					3ème irradiation 303e jour				
Poids en g	Ca en g	P en g	$\frac{Ca}{P}$ corporel	$\frac{Ca}{P}$ osseux	Poids en g	Ca en g	P en g	$\frac{Ca}{P}$ corporel	$\frac{Ca}{P}$ osseux	Poids en g	Ca en g	P en g	$\frac{Ca}{P}$ corporel	$\frac{Ca}{P}$ osseux
150	1,10	0,78	1,41	1,93	281 10 petits	2,72	1,8	1,51	2,08	286	3,13	2	1,56	2,14
154	1,16	0,82	1,41	1,93	1 seule irradiation (13 petits) --- Tumeur									
158	1,21	0,85	1,42	1,95	294 13 petits	2,39	1,7	1,44	1,97	310	2,93	2,02	1,45	1,99
159	1,25	0,85	1,46	2,02	293 16 petits	2,75	1,79	1,54	2,10	325	3,19	1,98	1,61	2,21
160,5	1,25	0,87	1,44	1,98	302 9 petits	2,22	1,81	1,22	- pas de 3ème irradiation - Tumeur					
M 156	1,19	0,83	1,43	1,95	292	3 2,62	1,76	3 1,50	2,05	307	3,08	2	1,54	2,11
σ $\pm$0,04	$\pm$0,06	$\pm$0,03	$\pm$0,02	$\pm$0,03	$\pm$10	$\pm$0,2	$\pm$0,07	$\pm$0,05	$\pm$0,07	$\pm$23	$\pm$0,15	$\pm$0,01	$\pm$0,08	$\pm$0,1

On peut donc estimer que les doses délivrées au cours des irradiations neutroniques n'ont aucune incidence sur la composition en azote,chlore,calcium et phosphore du rat mâle OFA.

b) Chez la femelle

Les résultats obtenus permettent d'étudier simultanément : l'incidence possible des irradiations et l'influence de la gestation et de la lactation sur la composition du squelette et des tissus.

Les effets de la gestation et de la lactation ont été étudiés par SPRAY /97/, WIDDOWSON et DICKERSON /108/. Durant la gestation, le gain de poids représente essentiellement un incrément de tissus mous. Le taux de rétention azotée étant le même, la concentration de l'azote dans le tissu maternel ne se modifie pas. La taille évolue peu. A la délivrance, les concentrations en calcium et en phosphore de la mère sont plus élevées (de 1,2 % pour le calcium et de 9 % pour le phosphore) que celles de femelles témoins. Une partie du poids pris pendant la gestation est perdu pendant la lactation. Cependant la concentration en azote ne s'en trouve pas modifiée. Par contre les besoins des nouveaux-nés en calcium et en phosphore sont très grands. Le squelette de la mère doit en partie répondre à cette demande. Le lait contient 384 mg de calcium et 226 mg de phosphore/100 ml (rapport en poids Ca/P = 1,7). ELLINGER et col /42/ on étudié les variations de la composition chimique du fémur et du tibia pendant la lactation. Lorsque la diète est adéquate (calcium supérieur à 0,3 %) seul le calcium échangeable de l'os est libéré. Par contre, lorsque la diète est fortement carencée en calcium (0,04 %) l'os dans son ensemble est affecté.

A la suite de deux irradiations, trois sur quatre des femelles appartenant au lot 2 ont eu des petits. La composition en calcium, phosphore, chlore et azote de la femelle qui ne s'est pas reproduite est de :

Calcium	1,09 %
Phosphore	0,7 %
Chlore	0,103 %
Azote	2,8 %

L'incidence de deux irradiations sur la composition corporelle de ces quatre éléments peut donc être regardée comme nulle. Comparées à ces résultats, les pertes phosphocalciques des trois femelles analysées au sevrage sont sévères. Elles sont en moyenne de 13 % pour le calcium et de 11 % pour le phosphore. Par contre, le chlore (0,11 % de la masse corporelle) et à un moindre degré l'azote (2,91 % du poids du corps) sont en concentrations un peu plus élevées. Le déficit phosphocalcique accusé par ces femelles représente un rapport en poids Ca/P = 1,7. Ce chiffre correspond à celui qui existe dans le lait maternel. Ainsi, en dépit d'un apport alimentaire considéré comme suffisant, la lactation entraine des pertes phosphocalciques importantes. En l'absence de données précises sur la quantité de lait contenu dans les glandes mammaires à la fin de la lactation, l'estimation du calcium et du phosphore extra-osseux se révèle aléatoire. Le rapport Ca/P osseux n'a donc pas été calculé. Cependant, les pertes sont telles qu'elles doivent nécessairement atteindre le squelette.

La seconde irradiation des femelles du lot 3 se situe 50 jours après le sevrage. Toutes ont eu des petits. Toutefois, une de ces femelles est porteuse d'une tumeur mammaire apparue huit jours avant l'irradiation. L'analyse par radioactivation neutronique révèle que les concentrations en azote et chlore de cet animal sont normales. Par contre, le calcium corporel est beaucoup plus bas que celui des animaux irradiés pour la première fois au même âge. Cette perte est de 20 % (Tableau III.6);130 jours après le sevrage les trois femelles analysées ne présentent aucune anomalie. Les pertes subites ont été totalement compensées.

Ainsi l'incidence de deux irradiations sur la composition en azote, chlore, calcium et phosphore peut être considérée comme nulle chez le rat OFA.

3. Incidence de l'irradiation sur la reproduction

La reproduction des rats OFA permet d'analyser l'incidence d'une ou de deux irradiations sur l'intégrité de l'animal.

Six lots de rats ont été mis en reproduction soixante et onze jours en moyenne après avoir été analysés par radioactivation

neutronique. Ce temps a été ramené à quarante deux jours après la deuxième irradiation pour les animaux appartenant au lot 2. Ceci permet :

- de placer la reproduction de ce lot au même âge que celui du lot 3, soit 130 jours et ainsi

- de comparer l'influence de deux irradiations sur le taux de reproduction et le nombre de petits par portée non seulement à ceux de témoins de même âge mais aussi à ceux d'animaux n'ayant subi qu'une irradiation (lot 3).

Les deux derniers lots, jugés trop âgés, n'ont pas été croisés.

Les résultats obtenus ont été groupés dans le tableau III.7 .

Tous les mâles irradiés, qui ont servi de reproducteurs, ont été systématiquement choisis parmi les animaux ayant reçu la dose de radiations la plus élevée.

Après deux irradiations (39 et 88 jours) trois femelles sur quatre ont eu des petits. Ce résultat peu concluant ne permet pas d'apprécier une baisse possible du taux de fécondité. Par contre le nombre moyen de petits par portée est non significativement différent de celui des témoins. Les portées issues des femelles croisées après deux irradiations ont été conservées 225 jours. Leur reproduction placée à 95 jours a été tout à fait normale.

Aucune anomalie ni dans la croissance, ni dans le sex ratio n'a été rencontrée parmi les petits issus de parents irradiés.

Dans nos conditions expérimentales une irradiation n'influe pas sur la reproduction des rats OFA. L'âge seul diminue leur possibilité.

4. La dosimétrie

La dose totale absorbée par l'organisme au cours d'une irradiation doit, pour être connue avec précision, tenir compte de la répartition des neutrons incidents en fonction de l'énergie.

A partir du flux monoénergétique mesuré sur le porte-cible, la dose imputable aux protons et aux noyaux de recul produits par les neutrons rapides et la dose gamma, à quinze centimètres de pro-

Tableau III.7 - REPRODUCTION

Lots	Age à la reproduction	Modalités de la reproduction	Nombre de petits par portée ♀ irradiées ♂ irradiés	♀ Témoins ♂ irradiés	♀ Témoins ♂ Témoins
Lot 1 4 ♀ + 5 ♂	97	$1♂_{ir}$ x $2♀_{ir}$ + $2♀_T$ $1♂_T$ x $2♀_{ir}$ + $2♀_T$ $1♂_{ir}$ x $3♀_T$	13 9-14	10-16 10-12-15	11
Lot 2* 4 ♀ + 4 ♂	130	$1♂_T$ x $3♀_T$ $1♂_{ir}$ x $2♀_{ir}$ + $2♀_T$ $1♂_{ir}$ X $2♀_{ir}$ + $2♀_T$	 14 9-15	 10-13 11-16	10-15-16
Lot 3 5 ♀ + 5 ♂	130	$1♂_T$ x 1 $♀_{ir}$ + $3♀_T$ $1♂_{ir}$ x $2♀_{ir}$ + $2♀_T$ $1♂_{ir}$ x $2♀_{ir}$ + $2♀_T$	13 9-13 10-16	 10-12 15-16	11-13-16
Lot 4 5 ♀ + 5 ♂	140	$1♂_T$ x $1♀_{ir}$ + $3♀_T$ $1♂_{ir}$ x $2♀_{ir}$ + $2♀_T$ $1♂_{ir}$ x $2♀_{ir}$ + $2♀_T$	13 10-13 9-14	 11-15 10-14	10-12-12
Lot 5 3 ♀ + 3 ♂	146	$1♂_T$ x $3♀_T$ $1♂_{ir}$ x $2♀_{ir}$ + $2♀_T$ $1♂_{ir}$ x $1♀_{ir}$ + $3♀_T$	 11-13 15	 9-11 11-12-14	10-10-14
Lot 6 6 ♀ + 6 ♂	202	$1♂_T$ x $2♀_{ir}$ + $2♀_T$ $1♂_{ir}$ x $2♀_{ir}$ + $2♀_T$ $1♂_{ir}$ x $2♀_{ir}$ + $2♀_T$	11 9 8-10	 10-11 9	10-11
Lot 7 6 ♀ + 5 ♂	217	$1♂_T$ x $2♀_{ir}$ + $2♀_T$ $1♂_{ir}$ x $2♀_{ir}$ + $2♀_T$ $1♂_{ir}$ x $1♀_{ir}$ + $2♀_T$	9-9 10	 8 10	7-11

* Lot 2 - La reproduction a été placée après 2 irradiations.

fondeur, ont été calculées. Ces doses totales moyennes, ainsi estimées, sont données dans le tableau III.8.

Ces doses relativement élevées représentent environ 1/15 ème de la dose requise pour tuer 50 % d'aniamux en un mois (DL_{50}).

5. Incidence de l'irradiation sur le développement des tumeurs mammaires

5.1 - Fréquence spontanée

Les rats d'origine Sprague-Dawley présentent spontanément des tumeurs mammaires dont la fréquence dépend à la fois de l'âge et du sexe.

Les travaux de DAVIS et col. /36/, VOGEL et col./104 et 105/ et SHELLABARGER et col. /92/ ont montré que :

- chez la femelle, avant un an, le taux des tumeurs est très faible (environ 2 %). Par contre, durant la deuxième et troisième année de vie la fréquence d'apparition se situe entre 48 et 54 %.

- chez le mâle, il n'y a pratiquement pas de tumeur avant l'âge de quinze à dix-huit mois et le taux des animaux atteints, au cours de leur vie, n'excède jamais 10 %.

Bien que quelques cas de tumeurs thyroïdiennes ou surrénaliennes aient été diagnostiquées, la glande mammaire est le site privilégié des néoplasmes susceptibles de se développer chez ces animaux.

Un tiers des tumeurs sont bénignes (fibroadénomes). Parmi les tumeurs malignes, les fibrosarcomes sont les plus fréquents chez le mâle et les adénocarcinomes chez la femelle.

Les animaux utilisés au cours de ce travail ne permettent pas une étude de carcinologie expérimentale. Ils ont, en général, été sacrifiés beaucoup trop jeunes. Néanmoins, les observations qui ont pu être faites, ont été complétées par les résultats communiqués par le centre des Oncins.

Age à l'irradiation		Doses absorbées en Rads	
♀	♂	♀	♂
34	35	35	30
39	40	35-30-20	31-27-30
53	55	38-29-27	32-30-35
64	67	34	38
78	79	38	33
77	119	34	33
152	153	38	30
222	228	37	27
435	437	31	38

Tableau III.8 - ESTIMATION DE LA DOSE ABSORBEE AU COURS D'UNE IRRADIATION DE DIX MINUTES EN NEUTRONS DE 14 MeV PARTIELLEMENT THERMALISES

Les tumeurs spontanées des rats de souche OFA se répartissent de la façon suivante :

- chez le mâle on ne rencontre pas de tumeur avant l'âge de dix huit mois. De dix huit à vingt quatre mois le taux est sensiblement de 10 %. Ce chiffre peut atteindre 18 % si l'observation se poursuit jusqu'à vingt six mois.

- chez la femelle il n'y a pratiquement pas de tumeur avant quinze mois et après cet âge la fréquence spontanée est de 20 % jusqu'à dix huit mois et de 60 % jusqu'à vingt six mois.

La plupart des tumeurs rencontrées chez les deux sexes sont mammaires. L'étude histologique, encore très incomplète, révèle que 30 % de ces tumeurs sont bénignes.

Ces données confirment l'origine de la souche.

5.2 - Fréquence après irradiation

Au cours de ces dix dernières années les travaux de VOGEL et ZALDIVAR /103-104-105/, de SHELLABARGER et de son équipe /13-35-92/ ont mis en évidence un certain nombre de points qui vont permettre d'analyser les résultats obtenus dans le cadre de cette étude.

La répartition des tumeurs mammaires apparues chez quelques animaux en expérience après une ou plusieurs irradiations de dix minutes en neutrons de 14 MeV partiellement thermalisés est donnée dans le tableau III.9.

Ces résultats peuvent être ainsi analysés :

- A la suite d'une irradiation quel que soit l'âge auquel l'irradiation a été pratiquée :

  . six femelles sont atteintes
  . aucun mâle
  . les tumeurs sont uniques et leur apparition s'échelonne entre 90 et 162 jours après l'irradiation.

- A la suite d'irradiations répétées :

  . dans le lot 2 quatre femelles sont atteintes vers 270 jours
  . chez les trois dernières femelles du lot 3, vers 380 jours apparaît une tumeur mammaire.

Tableau III.9. Taux de tumeurs mammaires apparues chez les rats de souche OFA (origine Sprague-Dawley) après une ou plusieurs irradiations de dix minutes en neutrons de 14 MeV partiellement ralentis.

Nombre d'animaux par lot		Ages à l'irradiation en jours		Nombre de tumeurs		Ages à l'apparition de la tumeur en jours		Ages au moment du sacrifice	
♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂
4	5	34	35	0	0	-	-	206	160
4	4	39-88-183	40-89-184	4	0	270	-	300	272
5	5	53-222-303	55-228-304	5	2	143-215-380 à 390	298-364	200- 218-400	500
5	4	64	67	1	0	200	-	320	320
3	3	78	79	1	0	205	-	330	330
6	6	117	118	1	0	212	-	362	362
6	5	152	153	1	0	202	-	292	292
4	4	222	228	0	0	-	-	360	350
5	5	435	437	0	0	-	-	580	517

Deux mois plus tard, chaque femelle est porteuse de trois tumeurs toutes mammaires sauf une (1 tumeur thyroïdienne). L'autopsie révèle que plusieurs ganglions lymphatiques sont également nécrosés.

. dans ce même lot deux mâles sont porteurs d'une tumeur mammaire,

l'un est âgé de 298 jours,
l'autre de 364 jours.

Donc, parmi les animaux en expérience :

13 femelles sur 42 soit 31 % et
2 mâles sur 41 soit 5 %,

sont porteurs de tumeurs mammaires.

Parmi les témoins (45 ♀ et 45 ♂) une seule tumeur est apparue chez une femelle âgée de 200 jours. Ce taux (2 %) est comparable à la fréquence spontanée d'apparition de tumeur chez les femelles d'origine Sprague-Dawley.

Dix des treize femelles irradiées et porteuses de tumeur, ainsi que la femelle témoin ont eu des petits.

Les deux derniers lots (8 et 9) irradiés n'ont pas eu de tumeur durant leur première année de vie.

L'absence de tumeur chez les animaux irradiés les plus jeunes n'est malheureusement pas significative. Ils ont été sacrifiés trop tôt.

L'induction tumorale au cours de la première année de vie par irradiation neutronique pose deux problèmes :

a) les modalités d'irradiation et la dose absorbée

Pour des doses équivalentes les rayons X et le rayonnement γ induisent les mêmes effets. Il existe une relation linéaire entre des doses uniques, comprises entre 25 et 400 rads, le temps de latence et le taux d'induction tumorale.

Cette relation n'existe pas pour les neutrons de fission. En effet VOGEL /105/ a irradié des femelles Sprague Dawley âgées de deux à trois mois avec des neutrons de fission (énergie moyenne des neutrons : 1 MeV).

Les résultats obtenus sont donnés dans le tableau ci-dessous que nous empruntons à VOGEL.

Doses absorbées en une seule irradiation en rads .	Taux de tumeurs apparues dans les 18 mois qui suivent l'irradiation.
250	76,4
150	87,1
50	83,9
35	80
18-22	73,2
10-12	85,3
5	77,8
témoins	48,3
2	30 (avant l'âge de 1 an)

L'auteur estime que le taux de tumeur du dernier lot (2 Rads) aurait atteint 80 % si les animaux qui le composent avaient été suivis plus longtemps.

L'irradiation localisée de la glande mammaire (dose : 35 Rads) à l'aide d'un accélérateur Van de Graaf induit 75 % de tumeurs. VOGEL en conclut que localisée ou répartie à l'ensemble du coprs une même dose absorbée à la suite d'irradiations par des neutrons d'énergies différentes ne change pas d'une façon significative ni qualitativement ni quantitativement le type de néosplasme induit.

Pour des doses élevées (400 à 800 Rads), l'efficacité biologique relative (R.B.E.) des neutrons rapides est de deux à trois fois plus forte que celle des rayons X ou du rayonnement gamma.

Les travaux de VOGEL et SHELLABARGER permettent d'affirmer que 5 Rads absorbés à la suite d'irradiation par des neutrons de fission induisent une fréquence de tumeurs supérieure à celle obtenue avec 100 Rads de rayons X.

Selon VOGEL et ZALDIVAR, à faible dose, la R.B.E. des neutrons de fission dans l'induction tumorale pourrait être de vingt à soixante fois plus élevée que celle des rayons X.

KELLERER et ROSSI /65 et 90/ ont émis l'hypothèse que la R.B.E. pourrait être de 100 par rapport aux rayons X quand la dose de neutrons est approximativement de 1 rad.

En irradiation neutronique, chez la femelle Sprague-Dawley, il n'y aurait pas de seuil avant un rad à la carcinogénèse. S'il existe, il serait de l'ordre de quelques centaines de millirads.

b) Le temps de latence

Bien que des doses de neutrons de fission comprises entre 50 et 250 Rads ne modifient pas significativement le temps de latence, au-dessous de 50 Rads le temps moyen d'apparition augmente lorsque la dose décroît.

Cependant, CRONKITE et col. /35/ ont démontré qu'il existe une relation entre le temps de latence et le type histologique auquel appartient la tumeur.

En effet, 38 % des adénocarcinomes apparaissent dès le troisième ou le quatrième mois après l'irradiation. Par contre, la plupart (78 %) des adénofibromes sont tardifs.

HARTWIG et col. /57/ après une étude histologique des tumeurs mammaires apparues chez des rats ayant subi une irradiation neutronique et chez des témoins suggèrent que le temps de latence des tumeurs malignes est beaucoup plus court.

Dans le cadre de cette étude seuls quelques prélèvements ont été analysés.

Chez les femelles deux adénocarcinomes ont été identifiés. Ils sont apparus 95 et 162 jours après une irradiation.

Chez le mâle aucune tumeur n'étant apparue à la suite d'une seule irradiation, on ne peut analyser le temps de latence en fonction du type histologique de la tumeur. Cependant il faut noter que sur un mâle âgé de 298 jours, soit 245 jours après la première irradiation et 70 jours après la seconde, s'est développée une tumeur bénigne. C'était un fibro adénome.

SHELLABARGER et son groupe ont également souligné le rôle important joué par l'ovaire en fonctionnement dans l'induction tumorale.

79 % des femelles âgées de 40 jours soumises à 400 Rads de rayons X auront une tumeur dans les dix mois qui suivent l'irradiation. L'ovarectomie pratiquée avant ou après l'irradiation réduit considérablement mais ne supprime pas le nombre de tumeurs (23 %). La castration ou l'absence de testicules jouent peu sur la réponse.

L'environnement hormonal déterminé par le sexe influe non seulement sur le taux des tumeurs mais aussi sur le temps de latence.

Bien qu'une étude approlondie, dépassant le cadre de ce travail, n'ait pas été faite, on peut cependant admettre que :

- l'irradiation neutronique telle que nous l'avons pratiquée, élève la fréquence et diminue le temps de latence des tumeurs mammaires chez les rats de souche OFA.

- les irradiations répétées augmentent significativement le nombre de tumeurs sur un même animal et le pourcentage des animaux atteints.

- le seuil de la carcinogénèse étant probablement très bas, il eut été inutile de diminuer la dose absorbée au cours de l'irradiation (35 Rads en moyenne). En effet dans nos conditions opératoires, l'analyse quantitative, en particulier du calcium, est incompatible avec un flux de neutrons ne représentant que quelques centaines de millirads. Or, à partir de 1 Rad, le taux de tumeurs induit aurait été identique à celui que nous avons obtenu.

- l'âge des animaux à la première irradiation paraît important. La présence d'ovaires en fonctionnement ainsi que la reproduction favorise certainement l'induction tumorale.

IV - CONCLUSION

L'étude in vivo de la composition en azote,chlore,calcium et phosphore, en fonction de l'âge et du sexe, a été faite par radioactivation neutronique sur des rats OFA d'origine Sprague Dawley soumis à une diète contenant 9,2 mg de Ca et de phosphore par gramme de nourriture. L'immaturité du jeune rat se traduit par sa composition chimique : de faibles concentrations en calcium, phosphore et azote , une concentration élevée en chlore.

Au cours de la croissance la rétention azotée s'accompagne d'une baisse de la concentration en chlore. A partir de 90 jours chez la femelle et de 100 jours chez le mâle ces deux éléments représentent respectivement :

- 3,14 % ± 0,009 et 0,103 % ± 0,003 de la masse corporelle de la femelle et

- 3,28 % ± 0,1 et 0,097 % ± 0,002 de la masse corporelle chez le mâle. Ces différences ne sont pas significatives. Ainsi 3,2 % d'azote et 0,1 % de chlore entrent dans la composition de l'organisme du rat à l'âge adulte.

L'évolution du calcium suit pour 99 % du calcium corporel la croissance du squelette. La concentration de cet élément augmente donc pendant toute la phase intensive du développement. Ce n'est que vers 120 jours pour la femelle et 150 jours pour le mâle que la concentration doit être considérée comme constante. Cet élément représente alors 1% ± 0,03 du poids du corps chez la femelle et 0,82 % ± 0,04 chez le mâle.

Des quatre éléments étudiés, le phosphore est celui dont la concentration est la plus précocement stabilisée. Un niveau maximum de 0,55 % ± 0,02 est atteint chez le mâle vers 40 jours et chez la femelle de 0,66 % ± 0,02 à partir de 60 jours.

Trois irradiations d'un même animal, réparties sur toute la durée de l'étude, ont été pratiquées. Elles permettent de vérifier les résultats obtenus à la suite d'irradiations uniques.

L'incidence de la reproduction sur l'organisme maternel a été étudiée à la fin de la lactation, puis 50 et 130 jours après le sevrage. Les concentrations en azote et en chlore ne sont pas affectées par la reproduction. Par contre, en dépit de la diète, la lactation entraîne des pertes phosphocalciques estimées à 13 % pour le calcium et 11 % pour le phosphore. 130 jours après le sevrage ces pertes seront totalement compensées.

L'estimation du phosphore extra-osseux a été obtenue, chez l'adulte, à partir de la détermination in vivo des masses corporelles de calcium et de phosphore et de l'analyse du rapport Ca/P au niveau des os longs. Il représente, pour les deux sexes, 27 % du

phosphore corporel dans nos conditions de diète. La connaissance de cette valeur a permis d'étudier l'évolution du rapport Ca/P osseux en fonction de l'âge et du sexe. Relativement stable pendant la croissance, le rapport Ca/P osseux s'élève progressivement à l'âge adulte. Ainsi l'os néoformé tendrait vers une structure moléculaire proche d'un phosphate tricalcique hydraté (9 Ca/6 PO_4 en poids = 1,94) qui évoluerait, au cours du temps, en hydroxyapatite (10 Ca/6 PO_4 = 2,15).

La dose moyenne absorbée au cours d'une irradiation de dix minutes par l'organisme du rat est de l'ordre de 35 Rads. Quoique relativement élevée (1/15ème de la dose léthale) elle n'a provoqué aucune perturbation de la reproduction. Cependant l'irradiation neutronique élève sensiblement la fréquence et diminue le temps de latence des tumeurs mammaires qui, chez les rats de souche OFA, se rencontrent spontanément et à un taux d'apparition voisin de 50 % chez la femelle au cours de la deuxième année de vie.

CONCLUSION

Cette étude met en lumière la place que peut occuper l'analyse par radioactivation neutronique "in vivo" parmi les méthodes appliquées à la détermination de la composition élémentaire de l'organisme. Cette possibilité est d'un intérêt physiologique considérable car les moyens d'investigation de la matière vivante sont encore peu nombreux.

L'examen radiologique pratiqué avec des rayons X ne permet pas de saisir les variations inférieures à 30 % de la masse totale du squelette. Les possibilités offertes par la photodensitométrie ne donnent qu'une évaluation localisée de la masse osseuse. En revanche, l'analyse par radioactivation neutronique apporte une notion supplémentaire, puisqu'elle permet l'identification et la mesure des constituants de la matière biologique.

Les méthodes fondées sur l'emploi d'indicateurs supposent que l'indicateur choisi en fonction de l'élément ou de la molécule étudiés puisse être mesuré tout au long de son transit dans le système. Les résultats obtenus représentent donc des valeurs moyennes de masses échangeables intégrées sur toute la durée de l'expérience. L'analyse par radioactivation neutronique, par contre, donne une valeur instantanée de la composition élémentaire réelle.

Dans la mesure où la dose de radiations absorbées au cours de l'irradiation neutronique ne porte pas atteinte à l'intégrité de l'organisme et d'autre part dans la mesure où la radioactivité induite peut être rapportée à celle d'un témoin, de géométrie et de composition aussi proches que possible de celles de l'échantillon et irradié dans les mêmes conditions, on réalise les conditions d'une analyse "in vivo" non destructive. Malheureusement, le pouvoir de pénétration des neutrons dans les tissus est limité. L'homogénéité d'irradiation pose donc un problème difficile à résoudre. La distribution du flux à l'intérieur de l'échantillon est fonction de l'énergie des neutrons incidents, de la distance de la cible à la source

neutronique et des modalités d'irradiation. Ainsi, selon les techniques utilisées, les variations de flux rencontrées à l'intérieur de la cible sont de ± 3,5 % à±30 % pour les flux de neutrons thermiques et de±3% à±20% pour les flux de neutrons rapides. De ces différents résultats on peut estimer que ce sont les neutrons de hautes énergies (14 MeV) qui permettent la meilleure homogénéité d'irradiation à l'intérieur du corps humain. Le spectre gamma obtenu dans ces conditions est souvent complexe. Les réactions nucléaires sur des éléments distincts peuvent conduire à la formation d'un même radioélément et être la cause de résultats erronés.

Apprécier la précision et la portée de la méthode en clinique humaine présentent des difficultés. L'expérimentation animale offre de plus larges possibilités car les impératifs dosimétriques sont moins stricts. Ainsi, les dosages simultanés de l'azote, du chlore, du calcium et du phosphore avec des neutrons de 14 MeV ont été pratiqués chez le rat. Cependant, le ralentissement partiel des neutrons de 14 MeV et le gradient de flux thermique dans un volume relativement petit ne permettent pas une détection suffisamment précise de radioéléments provenant de réactions n,y . Les neutrons incidents doivent être partiellement thermalisés.

La sensibilité, la précision et la reproductibilité de la méthode ont permis l'étude de la variation de la composition en azote, chlore, calcium et phosphore du rat au cours de la croissance (de 30 à 440 jours) et des principaux évènements de la vie biologique tels que la puberté chez les deux sexes, la reproduction et la lactation.

Il a été également vérifié que des irradiations, répétées sur le même animal, n'entrainaient pas des perturbations biologiques susceptibles de fausser les résultats. La composition élémentaire de l'organisme, tout au moins en ce qui concerne les éléments étudiés, n'est pas altérée à la suite de trois irradiations en neutrons de 14 MeV partiellement thermalisés. Quoique relativement élevée, la dose moyenne absorbée par l'organisme du rat au cours d'une irradiation de dix minutes n'entraine aucune modification du taux de fécondité. Par contre, l'irradiation neutronique élève sensiblement la fréquence et diminue le temps de latence des tumeurs mammaires qui, chez les rats OFA d'origine Sprague-Dawley, se rencontrent spontané-

ment et à un taux d'apparition voisin de 50 % chez la femelle, non négligeable chez le mâle, au cours de la deuxième et troisième année de vie.

Ces résultats permettent de conclure que l'analyse par radioactivation neutronique "in vivo" est une méthode suffisamment reproductible, sensible et précise pour apporter une contribution valable à l'étude de phénomènes physiopathologiques.

BIBLIOGRAPHIE

/1/ ADAMS T.H. et NORMAN A.W.
Studies on the mecanism of action of calciferol. I. Basic parameters of vitamin D mediated calcium transport. J. Biol. Chem., 1970, 245, 4421-31.

/2/ ALOIA J.F., ROGINSKI M.S., JOWSEY J., DOMBROWSKI C.S., SHUKLA K.K., COHN S.H.
Skeletal metabolism and body composition in acromegaly. J. Clin. Endocrinol. Metab., 1972, 35, 543.

/3/ Analysis of measurement data. NBS. Hanbook 91. Experimental Statistics 2-6.

/4/ ANDERSON J., OSBORN S.B., TOMLINSON R.W.S., NEWTON D., RUNDO J., SALMON L., SMITH J.W.
Neutron-activation analysis in man in vivo. A new technique in medical investigation. Lancet, 1964, 11, 1201-5.

/5/ AUBERT J.P. et MILHAUD G.
Méthode de mesure des principales voies du métabolisme calcique chez l'hcmme. Biochim. Biophys. Acta, 1960, 39, 122.

/6/ AUBERT J.P., MOUKHTAR M.S., MILHAUD G.
Etude du métabolisme du calcium chez le rat à l'aide du calcium-45. III. Les relations entre les différents processus chez le rat normal. Rev. Franç. Etudes Clin. et Biol., 1961, 6, 1034.

/7/ BACH R.L. et CASWELL R.S.
Energy transfer to matter by neutrons. Radiat. Res., 1968, 35, 1.

/8/ BALLOT G.
Application des méthodes statistiques aux problèmes de la mesure de la radioactivité d'un corps. CEA.CENS. 1961.

/9/ BATTYE C.K., TOMLINSON R.W.S., ANDERSON J., OSBORN S.B. "Experiments relating to whole-body activation analysis in man in vivo using 14 MeV incident neutrons". Nuclear Activation Techniques in the Life Sciences (Proc. Symp. Amsterdam, 1967), IAEA, Vienna, 1967, 573.

/10/ BATTYE C.K., KNIGHT V., MARSHALL T.O., KNIGHT A., GODFREY B.E. Use of 14 MeV neutrons for activation analysis of five elements in man-like models. Nucl. Instrum. Methods, 1971, 92, 601.

/11/ BODDY K., HOLLOWAY I., ELLIOTT A. "Preliminary results of measuring total-body calcium with a new facility for total-body in vivo activation analysis". In vivo Neutron Activation Analysis (Proc. Pan. Vienna, 1972), IAEA, Vienna, 1973, 163.

/12/ BODDY K., EAST B.W., ROBERTSON I., ALEXANDER W.D., WILSON G.M. "A review of the technique of measuring the intrathyroidal content of iodine in man by in vivo activation analysis. In vivo Neutron Activation Analysis (Proc. Pan. Vienna, 1972), IAEA, Vienna, 1973, 79.

/13/ BOND V.P., CRONDITE E.P., LIPPINCOTT S.W., SHELLABARGER C.J., Studies on radiation-induced mammary gland neoplasia in the rat. III. Relation of the neoplastic response to dose of total-body radiation. Rad. Res., 1960, 12, 276-85.

/14/ BORLE A.B. Calcium transport in kidney cells and its regulation. Cellular Mechanisms for Calcium Transfer and Homeostasis. (Nichols G. Jr., Wasserman R.H. eds) Academic Press. New-York. 1971, 151 à 174.

/15/ BRONNER F. et AUBERT J.P. Bouc metabolism and regulation of the blood calcium level in rats. Am. J. Physiol. 1965, 209, 887.

/16/ CAMERON J.R. et SORENSON J. Measurement of bone mineral in vivo. Science, 1963, 142, 230.

/17/ CARLMARK B. et REIZENSTEIN P. Human body composition studies. I. Neutron activation of total body hydrogen and whole-body counting. In vivo Neutron Activation Analysis (Proc. Pan. Vienna, 1972), IAEA, Vienna, 1973, 113.

/18/ CARTIER P.
La minéralisation du cartilage ossifiable. VIII. Les pyrophosphates du tissu osseux. Bull. Soc. Chim. Biol., 1959, 41, 573.

/19/ CARTTAR M.S., McLEAN F.C., URIST M.R.
The effect of the calcium and phosphorus content of the diet upon the formation and structure of bone. Am. J. Pathol., 1950, 26, 307.

/20/ CHAMBERLAIN M.J., FREMLIN J.H., PETERS D.K., PHILIP H.
Total body sodium by whole body neutron activation in the living subject : further evidence for non-exchangeable sodium pool. Br. Med. J., 1968, 11, 583.

/21/ CHAMBERLAIN M.J., FREMLIN J.H., HOLLOWAY I., PETERS D.K.,
Use of the cyclotron for whole-body neutron activation analysis : theoretical and practical consideration. Int. J. Appl. Radiat. Isot., 1970, 21, 725.

/22/ CHAMBERLAIN M.J., FREMLIN J.H.
"Measurement of whole body nitrogen by pulsed neutron activation analysis". Radioaktive Isotope in Klinik und Forschung (Proc. Symp. Bad. Gastein, 1972) 1973, 10, Urban und Schwarzenberg, Munich, Berlin, Vienna.

/23/ CHEEK D.B., WEST C.D., GOLDEN C.C.
The distribution of sodium and chloride and the extracellular fluid volume in the rat. J. Clin. Inves. 1957, 36, 340-51.

/24/ CHEVALLIER F.
Synthèse du cholestérol chez le rat. Résultats obtenus à l'aide de l'acétate-I-C-14. Arch. Sc. Physiol. 1956, 10, 321.

/25/ CHEVALLIER F.
L'état dynamique du cholestérol. Science et Technique. 1960.

/26/ CHEVALLIER F.
Biodynamique et indicateurs. Cours et Documents de Biologie. (Gordon et Breach eds). 1973, 4.

/27/ COHN S.H., DOMBROWSKI C.S., FAIRCHILD R.G.
In-vivo neutron activation analysis of calcium in man. Int. J. Appl. Radiat. Isot., 1970, 21, 127.

/28/ COHN S.H., DOMBROWSKI C.S.
Measurement of total-body calcium, sodium, chlorine, nitrogen, and phosphorus in man by in vivo neutron activation analysis. J. Nucl. Med., 1971, 12, 499.

/29/ COHN S.H., SHUKLA K.K., DOMBROWSKI C.S., FAIRCHILD R.G.
"A total-body neutron activation facility employing portable (α,n) sources developed for medical research". Nuclear Activation Techniques in the Life Sciences, 1972 (Proc. Symp. Bled, 1972), IAEA, Vienna, 1972, 605.

/30/ COMAR D., RIVIERE R., RAYNAUD C., KELLERSHOHN C.
"Recherches préliminaires sur la composition et le métabolisme de l'os étudiés par radioactivation neutronique "in vivo" chez l'homme". Radioaktive Isotope in Klinik und Forschung (Proc. Symp. Bad Gastein, 1968) Urban et Schwarzenberg, 1968, 8, 186.

/30bis/ COMAR D., RIVIERE R., MAZIERE B., KELLERSHOHN C.
Mise en évidence du phosphore osseux chez l'homme in vivo par radioactivation neutronique et analyse du spectre des gammas de capture. Radioaktive Isotope in Klinik und Forschung (Proc. Symp. Bad Gastein, 1970), 1970, 9, 431.

/31/ COMAR D., LOC H.C., RIVIERE R., KELLERSHOHN C.
Utilisation de l'analyse par radioactivation et du comptage sur corps entier pour l'étude du métabolisme du rubidium chez l'homme normal. Radioaktive Isotope in Klinik und Forschung (Urban et Schwarzenberg eds) 1970, IX, 245.

/32/ COPP D.H. et KUCZERPA A.
"Effect of dietary calcium and phosphate on the response to parathormone". (Proc. Ann. Meeting Endocrine Soc. United States) 1966, 48, 71.

/33/ COPP D.H. et KUCZERPA A.
A new bioassay for calcitonin and effect of age and dietary calcium and phosphate on the response. Calcitonin. Proc. Symp. on Thyrocalcitonin and the C Cells. (Taylor S. ed), 1968, 18.

/34/ COTLOVE E. et HOGBEN C.A.M.
"Chloride", Mineral Metabolism 2 B, (Comar C.L. et BRONNER F. eds). Academic Press, New-York, London. 1964, ch. 27.

/35/ CRONKITE E.P., SHELLABARGER C.J., BOND V.P., LIPPINCOTT S.W. Studies on radiation induced mammary gland neoplasia in the rat. I. The role of the ovary in the neoplastic response of the breast tissue to total or partial body X-irradiation. Rad. Res. 1960, 12, 81-93.

/36/ DAVIS R.K., STEVENSON G.T., BUSCH K.A. Tumor incidence in normal Sprague-Dawley rats. Canc. Res., 1956, 16, 194-97.

/37/ DAY H.G. et McCOLLUM E.V. Mineral metabolism, growth and symptomology of rats on a diet extremely deficient in phosphorus. J. Biol. Chem., 1939, 130, 269.

/38/ DEAKINS M. Changes in ash, water and organic content of pig during calcification. J. Dental Res. 1942, 21, 429.

/39/ DICKERSON J.W.T. et WIDDOWSON E.M. Some effects of accelerating growth. II. Skeletal development. Proc. Roy. Soc. B. 1960, 152, 207.

/40/ EANES E.D., HARPER R.A., GILLESSEN I.H., POSNER A.S. An amorphous component in bone mineral. Proc. 4th European Symp. Calcified Tissues, Leiden 1966, Abridged (Gaillard P.J., Van den Hooff A. et Steendijk R. eds). Excerpta Med. Amsterdam. 1966, 24.

/41/ EANES E.D. et POSNER A.S. Biological Calcification : Cellular and Molecular Aspects. (Schraer H. ed) Appleton, New-York. 1970.

/42/ ELLINGER G.M., DUCKWORTH J., DALGARNO A.C., QUENOUILLE M.H. Skeletal changes during prenancy and lactation in the rat : Effect of different levels of dietary calcium. Brit. J. Nutrition, 1952, 6, 235.

/43/ FLEISH H. et NEUMAN W.F. Mechanisms of calcification : Role of collagen, polyphosphates and phosphatase. Am. J. Physiol., 1961, 200, 1296.

/44/ FORBES G.B. et LEWIS A.M. Total sodium, potassium and chloride in adult man. J. Clin. Invest. 1956, 35, 596.

/45/ FRANCOIS P. et HERMAN H.
Le composé minéral fondamental des tissus calcifiés. II. Les sels osseux contiennent un phosphate de calcium différent de l'hydroxyapatite. Bull. Soc. Chim. Biol. 1961, 43, 643.

/46/ GEISLER J.Z. et NEUMAN W.F.
The membrane control of bone potassium. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. (N.Y.), 1969, 130, 608.

/47/ GEKLE D., STRÖDER J., ROSTOCK D.
The effect of vitamin D on renal inorganic phosphate reabsorption of normal rats, parathyroidectomized rats and rats with rickets. Pediat. Res. 1971, 5, 40-52.

/48/ GILLESPIE F.C. et ORR J.S.
The prediction of dose due to an internal radioisotope by application of the occupancy principle. Phys. Med. Biol., 1969, 14, 639.

/49/ GILLESPIE F.C., SCHIMMINS J.G., ORR J.S., SMITH D.A.
Use of the occupancy principle in studies of calcium metabolism. Calc. Tiss. Res.,1970,4(supplément),89-90.

/50/ GILLESPIE F.C., SCHIMMINS J.G., LENIHAN J.M.A.
Total body bromine : Estimation by occupancy principle and neutron activation analysis. Radiochem. Radioanal. Letters, 1970, 4/2/, 43-49.

/51/ GILMORE J.T. et HULL D.E.
Analyt. Biochem. 1962, 34, 187.

/52/ GUAZZONI P.
Contribution au dosage par activation neutronique de l'azote dans les aciers et le niobium. Thèse Faculté des Sciences, Grenoble. 1970 .

/53/ GUEY A., TOUSSET G., MANIN J.P.
La détermination "in vivo" du calcium corporel par activation neutronique ; étude des paramètres expérimentaux. Radioaktive Isotope in Klinik und Forschung. 1972 .

/54/ HAMMET F.S.
A biochemical study of bone growth. I. Changes in the ash, organic matter and water during growth (Mus Norvegicus Albinus) J. Biol. Chem. 1925, 64, 409.

/55/ HAMMET F.S.
A biochemical study of bone growth. II. Changes in the calcium, magnesium and phosphorus of bone during growth. J. Biol. Chem. 1925, 64, 685.

/56/ HARRIS W.H.
A microscopic method of determining rates of bone growth. Nature, 1960, 188, 1038.

/57/ HARTWIG Q.L., KENT S.P., SPROUL J.A. Jr.
Effect of chronic exposure to fast neutrons on the development of mammary tumors in the rat. Canc. Res., 1958, 18, 736-739.

/58/ HENRI K.M. et KON S.K.
Studies on the metabolism of calcium and phosphorus and on the availability of these elements from milk and from an inorganic source. Biochem. J., 1939, 33, 173.

/59/ HENRI K.M. et KON S.K.
The effect of age and the supply of phosphorus on the assimilation of calcium by the rat. Biochem. J., 1947, 41, 169.

/60/ HERMAN H. et DALLEMAGNE M.J.
The main mineral constituent of bone and teeth. Arch. Oral Biol., 1961, 5, 137.

/61/ HIRSCH P.F. et COOPER C.W.
Nutritional factors in relation to thyrocalcitonin. Dans "Parathyroid Hormone and Thyrocalcitonin (Calcitonin) (Talmage R.V. et Belanger L.F. eds) ICS 159, Excerpta Medica, Amsterdam. 1968, 381.

/62/ HOWARD J.E.
Present knowledge of parathyroid function with special emphasis upon its limitations. Ciba Fondation Symp. on Bone Structure and Metabolism. (Wolstenholme G.E.W. et O'Connor C.M. eds Boston, Mass.). 1956, 206.

/63/ JOHNSON R.H.
Tetracyclines : A review of the literature 1948 through 1963. J. Oral. Therap. Pharmacol., 1964, 1, 190.

/64/ JONES
Protection against Neutron Radiation NCRP Report n°38, 1971 .

/65/ KELLERER A.M. et ROSSI H.H.
RBE and the primary mechanism of radiation action. Rad. Res., 1971, 47, 15-34.

/66/ KELLERSHOHN C.
New formulation of earlier results in the kinetic theory of tracers. Application ot various problems in metabolism. Proc. of the Sec. Int. Conf. Med. Physics, Boston, 1969.

/67/ KELLERSHOHN C., COMAR D., LE POEC C.
Determination of the mercury content of human blood by activation analysis. J. Lab. Clin. Med., 1965, 66, 168.

/68/ KENNEDY J.W. et TALMAGE R.V.
Effects of thyrocalcitonin on bone phosphate without concurrent effects on calcium. "Calcium, Parathyroid Hormone and the Calcitonins" (Talmage R.V. et MUNSON P.L. eds.) Excerpta Medica. Amsterdam. 1972, 407-415.

/69/ KOWARSKI S. et SCHACHTER D.
Effects of vitamin D on phosphate transport and incorporation into mucosal constituents of rat intestinal mucosa. J. Biol. Chem. 1969, 244, 211-217.

/70/ LENIHAN J.M.A., COMAR D., RIVIERE R., KELLERSHOHN C.
Estimation of thyroid iodine in vivo by activation analysis. Nature, 1967, 214, 1221.

/71/ LINDQUIST B., BUDY A.M., McLEAN F.C., HOWARD J.L.
Skeletal metabolism in estrogen treated rats studied by means of Ca-45. Endocrinology, 1960, 66, 100.

/72/ MANERY J.F., DANIELSON I.S., HASTINGS A.B.,
Connective tissue electrolytes. J. Biol. Chem. 1938, 124, 359.

/73/ MEYER R.A. et TALMAGE R.V.
Effects of parathyroid hormone on bone calcium without concurrent effects on phosphate. "Calcium, Parathyroid Hormone and the Calcitonins". (Talmage R.V. et MUNSON P.L. eds) Excerpta Medica, Amsterdam. 1972, 422-428.

/74/ MILCH R.A., RALL D.P., TOBIE J.E.
Fluorescence of tetracycline antibiotics in bone. J. Bone Joint Surg. 1958, 40A, 897.

/75/ MILHAUD G., REMAGEN W., GOMES de MATOS A., AUBERT J.P.
Etude du métabolisme du rat à l'aide du calcium-45. I. Le rachitisme expérimental. Rev. Franç. Etudes Clin. et Biol., 1960, 5, 254.

/76/ MILHAUD G., PERAULT-STAUB A.M., STAUB J.F.
Diurnal variation of plasma calcium and calcitonin function in the rat. J. Physiol. 1972, 222, 559-567.

/77/ NAGAI T., FUJII I., MUTO H.
Total body nitrogen and protein determinated by in vivo fast neutron activation analysis. J. Nucl. Med. 1969, 10, 192.

/78/ NELP W.B., PALMER H.E., MURANO R., PAILTHORP K.G., HINN G.M., RICH C., WILLIAMS J.I., RUDD T.G., DENNEY J.D.
Measurement of total body calcium (bone mass) in vivo with the use of total body neutron activation analysis, J. Lab. Clin. Med.,1970, 76, 151.

/79/ NICHOLS G. Jr., NICHOLS N., WEIL W.B., WALLACE W.M.
The direct measurement of the extracellular phase of tissues. J. Clin. Invest. 1953, 32, 1299.

/80/ ORR J.S. et GILLESPIE F.C.
Occupancy principle for radioactive tracers in steady-state biological systems. Science, 1968, 162, 138.

/81/ OWEN M. et TRIFFITT J.T.
Plasma glycoproteins and bone. dans "Calcium, Parathyroid hormone and the Calcitonins" (Talmage R.V. et Munson P.L. eds) Excerpta Medica. Amsterdam. 1972, 316-325.

/82/ PALMER H.E.
The feasibility of determining total-body calcium by measuring Ar-37 in expired air after low level irradiation with 14 MeV neutrons. In Vivo Neutron Activation Analysis (Proc. Pan. Vienna, 1972) IAEA, Vienna, 1973, 203.

/83/ PALMER H.E. et NELP W.B.
Estimation of total-body phosphorus and nitrogen in vivo. In vivo Neutron Activation Analysis. (Proc. Pan. Vienna, 1972) IAEA, Vienna 1973, 132.

/84/ PERAULT-STAUB A.M., STAUB J.F., MILHAUD G.
Thyrocalcitonin and the physiological unstability of plasma calcium and phosphate in the rat. "9 th European Symp. on calcified Tissues". (Czitober H. et Eschberger J. eds) Vienna. 1972, 393.

/85/ PERAULT-STAUB A.M., STAUB J.F., MILHAUD G.
A new concept of plasma calcium homeostasie in the rat. Endocrinology , 1974, 95, 458.

/86/ POSNER A.S.
The structure, properties and formation of calcium phosphates in hard tissue. "Cellular Mechanisms for Calcium Transfer and Homeostasie" . (Nichols G. Jr. et Wasserman R.H. eds). Academic Press. 1971, 3.

/87/ PUSCHETT J.B., MORANZ J., KURNICK W.S.
Evidence for a direct action of cholecalciferol and 25-hydroxy-cholecalciferol on the renal transport of phosphate, sodium and calcium. J. Clin. Invest. 1972, 51, 373-385.

/88/ RIVIERE R., COMAR D., KELLERSHOHN C., ORR J.S., GILLESPIE F.C., LENIHAM J.M.A.
Estimation of thyroid iodine content by the occupancy principle. Lancet 1969, I, 389.

/89/ ROBINSON R.A.
Chemical analysis and electron microscopy in bone. "Bone as a tissue" (Rodahl K., Nicholson J.T. et Brown E.M. eds). McGRAW-HILL, New-York, 1960, 186.

/90/ ROSSI H.H. et KELLERER A.M.
Radiation carcinogenesis at low doses. Science. 1972, 175, 200-202.

/91/ RUNDO J. et BUNCE L.J.
Estimation of the total hydrogen content of the body. Nature, 1966, 210, 1023-1024.

/92/ SHELLABARGER G.J., CRONKITE E.P., BOND V.P., LIPPINCOTT S.W.
The occurence of mammary tumors in the rat after sublethal whole-body irradiation. Radiation Res., 1957, 6, 501-512.

/93/ SHERMAN H.C. et QUINN E.J.
The phosphorus content of the body in relation to age, growth and food. J. Biol. Chem.,1926, 67, 667.

/94/ SIMON Cl.
Une nouvelle méthode d'étude du métabolisme de l'iode : la méthode d'équilibre isotopique. Aspects cinétiques et quantitatifs obtenus chez le rat. Thèse n° 5141, Faculté des Sciences de Paris (1964).

/95/ SKLAVENITIS H., DEVILLERS C., COMAR D., KELLERSHOHN C.
Etude dosimétrique d'un faisceau collimé de neutrons thermiques destiné à l'analyse par radioactivation "in vivo". Int. J. Appl. Radiat. Isot. 1969, 20.

/96/ SPRAY C.M. et WIDDOWSON E.M.
The effect of growth and development on the composition of mammals. Brit. J. Nutrition, 1950, 4, 332.

/97/ SPRAY C.M.
A study of some aspects of reproduction by means of chemical analysis. Brit. J. Nutrition, 1950, 4, 354.

/98/ STERNBERG J.
Effect of tetracyclines on the turnover of Calcium-45 on young rats. Int. J. Appl. Radiation Isotopes, 1966, 17, 497.

/99/ TALMAGE R.V.
Calcium homeostasie - calcium transport - parathyroïd action. The effects of parathyroid hormone on the movement of calcium between bone and fluid. Clin. Orthop.,1969, 67, 210.

/100/ TALMAGE R.V.
Morphological and physiological considerations in a new concept of calcium transport in bone. Amer. J. Anat., 1970, 129, 457.

/101/ TALMAGE R.V.
Further studies on the control of calcium homeostasis by parathyroid hormone. "Calcium, Parathyroid Hormone and the Calcitonins". (Talmage R.V. et Munson P.L. eds) Excerpta Medica. Amsterdam. 1972, 422-428.

/102/ TIPTON I.H.
The distribution of trace metals in the human body. "Metal-Binding in Medicine" (Seven M.J. et Johnson L.A. eds). 1960, 27.

/103/ VOGEL H.H. Jr.
Mammary gland neoplams after fission neutron irradiation. Nature, 1969, 222, 1279-1281.

/104/ VOGEL H.H. Jr. et ZALDIVAR R.
Experimental mammary neoplasms : A comparison of effectiveness between neutrons, X and gamma radiation. Symp. on Neutrons in Radiobiology. ORNL, 1969, 207-229.

/105/ VOGEL H.H. Jr. et ZALDIVAR R.
Neutron-induced mammary neoplasms in the rat. Canc. Res., 1972, 32, 933-938.

/106/ WIDDOWSON E.M., McCANCE R.A., SPRAY C.M.
The chemical composition of the human body. Clin. Sci. 1951, 10, 113.

/107/ WIDDOWSON E.M. et McCANCE R.A.
Some effects of accelerating growth. I. General somatic development. Proc. Royal Soc. 1960, B 152, 188.

/108/ WIDDOWSON E.M. et DICKERSON J.W.T.
Chemical composition of the body. Mineral Metabolism 2A (Comar C.L. et Bronner F. eds) Academic Press, New-York, London . 1964, ch. 17.

/109/ WILLIAMS J.L., CARGOL L.H., PAILTHORP K.G., NELP W.B.
Neutron activation analysis of total body phosphorus in mice. J. Nucl. Med., 1970, 11, 576.